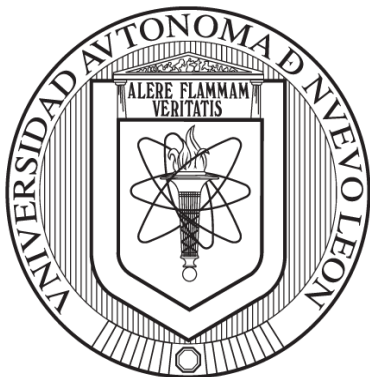


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DEL GEN N-ACETILTRANSFERASA 2
(*NAT2*) COMO MARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO POR TRATAMIENTO
DE PRIMERA LÍNEA CONTRA TUBERCULOSIS PULMONAR EN UNA
POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO Y ESTUDIOS DE DINÁMICA
MOLECULAR.

Por

Q.F.B. ALDO FERNANDO HERRERA RODULFO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA

Mayo de 2020

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DEL GEN N-ACETILTRANSFERASA 2
(NAT2) COMO MARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO POR TRATAMIENTO
DE PRIMERA LÍNEA CONTRA TUBERCULOSIS PULMONAR EN UNA
POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO Y ESTUDIOS DE DINÁMICA
MOLECULAR.

Aprobación de Tesis:

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez

Directora de Tesis

Dra. Beatriz Silva Ramírez

Directora Externa de Tesis

Dr. Omar González Santiago

Comité tutorial

Dra. María Del Rosario González González

Comité tutorial

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

Comité tutorial

Dra. Ma. Elena Cantú Cardénas

Sub-directora de Estudios de posgrado

RESUMEN

QFB Aldo Fernando Herrera Rodulfo

Fecha de Graduación: Julio 2020

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del proyecto: Análisis de polimorfismos del gen N-acetiltransferasa 2 (NAT2) como marcadores de daño hepático por tratamiento de primera línea contra tuberculosis pulmonar en una población del noreste de México y estudios de dinámica molecular.

Número de páginas: 62

Candidato para el grado de Maestro en

Ciencias con orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia.

Propósito y Método de Estudio: La tuberculosis pulmonar es una patología de carácter crónico-infecciosa, se presentan alrededor de 10 millones de nuevos casos y 1.5 millones de muertes por año en el mundo. Este proyecto es una primera aproximación en la relación entre el genotipo y la toxicidad farmacológica por el tratamiento anti-tuberculoso en población del noreste de México, con un diseño caso-control que incluye pacientes con tuberculosis pulmonar (TBP) y aquellos que desarrollan hepatotoxicidad al tratamiento.

Con el propósito de determinar la distribución de las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas en la población del noreste de México en el camino hacia una terapia basada en el genotipo para prevenir efectos adversos.

Contribuciones y Conclusiones: Nuestro trabajo comprende la determinación de las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de 91 individuos del noreste de México con TBP, de los cuales 7 desarrollaron hepatotoxicidad y son incluidos en el grupo de casos y el resto (84) en el grupo control. El SNP rs1801279 se encontró ausente en los casos y tan solo en un 1% en la población control, mientras que los SNPs rs1801280, rs1799929 y rs1799931 presentaron frecuencias alélicas similares entre casos y controles, por otra parte, los SNPs rs1041983 y rs1799930 se encontraron en mayor prevalencia en casos que en controles.

Los haplotipos derivados de *NAT2**5 fueron los más prevalentes después del haplotipo WT (*NAT2**4) en casos y controles, sin embargo, en casos se presentaron los haplotipos *NAT2**5Va, *NAT2**5U y *NAT2**5J que se encontraron ausentes en la población control donde el haplotipo más frecuente fue *NAT2**5B.

Con base a estos resultados se realizaron estudios in-silico de dinámica molecular de los SNPs líderes de estos haplotipos: rs1801280 (que corresponde a un cambio de aminoácido I114T), rs1799930 (que corresponde a un cambio de aminoácido R197Q) y rs17999930 (que corresponde a un cambio de aminoácido G286E) y la combinación de estos: rs1801280 + rs1799930 y rs1801280 + rs1799931 debido a que estas combinaciones se encuentran presentes en los haplotipos *NAT2**5Va, *NAT2**5U y *NAT2**5J encontrados únicamente en casos.

Nuestros resultados en el estudio in-silico de dinámica molecular indican que la disminución de la actividad de *NAT2* por efecto de los SNPs rs1801280, rs1799930 y rs1799931 podría deberse a un cambio en el acomodo espacial de los aminoácidos de unión al cofactor, debido a la importancia del sitio de unión al cofactor en el mecanismo de reacción enzimático, puesto a que este dona el grupo acetil al residuo C68 quien posteriormente lo donará al sustrato de la enzima.

Estos resultados son el primer reporte hacia el desarrollo de una terapia basada en el genotipo con el propósito de evitar efectos adversos a la medicación antituberculosa que puedan poner en riesgo el cumplimiento del régimen antituberculoso y su efectividad.

Firma del asesor_____

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca nacional otorgada y por su apoyo mi formación académica.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por ser mi casa de estudios y abrirme las puertas de sus instalaciones, así como a su excelente personal docente.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social por abrirme sus puertas a sus instalaciones y a su cuerpo de Investigadores y estudiantes de quienes aprendí mucho en seminarios y pasillos de las instalaciones.

Quiero agradecer profundamente a mis asesoras de Tesis la Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez y la Dra. Beatriz Silva Ramírez por el tiempo y dedicación invertido en este proyecto y en mi formación académica. Gracias por su gran apoyo a lo largo de la maestría, corregir mis errores, enseñarme algo nuevo y ser un pilar importante en mi formación académica y científica.

A los Doctores que conforman mi comité tutorial El Dr. Omar González Santiago, la Dra. María del Rosario González González y el Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza por sus aportes en el proyecto de Tesis y en las aulas de clases que aportaron mucho a mi persona y formación académica.

Al Dr. Mauricio Carrillo-Tripp, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por su asesoría y guía en mi formación científica.

A mi familia, por su apoyo en cada aspecto de mi vida y persona.

A mis compañeros, a mi pareja y a mis amigos.

TABLA DE CONTENIDO

| CAPÍTULO | PÁGINA |
|--|--------|
| Resumen..... | iii |
| Agradecimientos | v |
| Lista de tablas..... | ix |
| Lista de figuras..... | x |
| Lista de cuadros..... | xi |
| Abreviaturas..... | xii |
| Capítulo 1..... | 1 |
| Introducción | 1 |
| 1.1 <i>Tuberculosis pulmonar</i> | 1 |
| 1.2 <i>Epidemiología</i> | 3 |
| 1.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y el tratamiento farmacológico | 4 |
| 1.4 Polimorfismos genéticos..... | 5 |
| 1.5 El daño hepático y el tratamiento antituberculoso. | 6 |
| 1.6 N-acetiltransferasa 2 (NAT2)..... | 8 |
| 1.7 Metabolismo del fármaco isoniazida..... | 11 |
| 1.8 Dinámica molecular | 13 |
| Capítulo 2..... | 15 |
| Antecedentes..... | 15 |
| 2.1 Actividad enzimática de los haplotipos lentos | 15 |
| 2.2 Efecto del cambio de aminoácido en la estructura enzimática | 15 |
| 2.3 Susceptibilidad al daño hepático por el tratamiento antituberculoso | 17 |
| 2.4 Genotipos <i>NAT2</i> en población mexicana | 17 |
| 2.5 Utilidad clínica | 18 |
| Capítulo 3..... | 19 |
| Justificación, hipótesis y objetivos | 19 |
| 3.1 Justificación | 19 |
| 3.2 Hipótesis..... | 19 |
| 3.3 Objetivos..... | 20 |
| 3.3.1 Objetivo general | 20 |

| | |
|--|----|
| 3.3.2 Objetivos específicos..... | 20 |
| Capítulo 4..... | 21 |
| Materiales y métodos..... | 21 |
| 4.1 Materiales | 21 |
| 4.1.1 Material biológico..... | 21 |
| 4.1.2. Equipo | 21 |
| 4.1.3 Plataformas bioinformáticas. | 22 |
| 4.1.4 Plataformas estadísticas | 22 |
| 4.1.5 Reactivos..... | 22 |
| 4.1.6 Materiales..... | 22 |
| 4.1.7 Ubicación..... | 23 |
| 4.2 Métodos | 23 |
| 4.2.1 Pacientes del estudio | 23 |
| 4.2.2 Criterios de inclusión y exclusión..... | 23 |
| 3.2.2 Criterio de daño hepático | 24 |
| 4.2.4 Protocolo de extracción de dna genómico..... | 25 |
| 4.2.5 Genotipificación..... | 26 |
| 4.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real | 28 |
| 4.2.7 Dinámica molecular | 29 |
| Capítulo 5..... | 32 |
| Resultados | 32 |
| 5.1 Genotipificación..... | 32 |
| 5.2 Dinámica molecular | 37 |
| Capítulo 6..... | 45 |
| Discusión de resultados..... | 45 |
| Capítulo 7..... | 50 |
| Conclusiones y perspectivas | 50 |
| 6.1 Conclusiones | 51 |
| 6.2 Perspectivas | 51 |
| Capítulo 8..... | 53 |
| Disposición de residuos..... | 53 |

| | |
|------------------------------|----|
| Capítulo 9..... | 54 |
| Bibliografía..... | 54 |
| Resumen autobiografico | 62 |

Lista de Tablas

| Tabla | Página |
|--|--------|
| 1. Hitos propuestos por la OMS para disminuir la mortalidad e incidencia de la tuberculosis, propuestos en la estrategia mundial fin de la tuberculosis..... | 3 |
| 2. Características de las variantes haplotípicas de <i>NAT2</i> | 10 |
| 3. Definición de acetiladores lentos, intermedios y rápidos. | 11 |
| 4. Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa. | 27 |
| 5. Condiciones de reacción..... | 27 |

Lista de Figuras

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Factores involucrados en el tratamiento antituberculoso y la adecuada respuesta farmacológica. | 2 |
| 2. Implicación de los polimorfismos genéticos tipo SNP en la síntesis proteica y actividad enzimática. | 6 |
| 3. Secuencia codificante y polimorfismos de un solo nucleótido del gen <i>NAT2</i> | 9 |
| 4. Mecanismo hepatotóxico propuesto para el desarrollo del daño hepático inducido por INH. | 13 |
| 5. Gráficos obtenidos en la determinación génica de las muestra evaluadas..... | 28 |
| 6. Valores de RMSD (desviación media cuadrática de posiciones atómicas) de las modelos. | 38 |
| 7. Promedio de valores de RMSF superiores a 1 Å de cada una de las variantes. | 40 |
| 8. División en código de colores de los dominios de N-arilamina transferasa 2. ... | 41 |
| 9. Aminoácidos de la triada catalítica y sitio de unión al cofactor en la estructura cristalizada de <i>NAT2</i> WT. | 42 |
| 10. Gráfica de radar de las distancias que existen entre los átomos más pesados de los aminoácidos del sitio catalítico, y el sitio de unión al cofactor entre las variantes proteicas..... | 43 |
| 11. Visualización de la 5 variantes proteicas de <i>NAT2</i> y la representación de los átomos de unión al cofactor..... | 44 |

Lista de Cuadros

| Cuadro | Página |
|--|--------|
| 1. Valores de enzimas transaminasas en los pacientes incluidos en casos y controles. | 32 |
| 2. Frecuencias genotípicas y alélicas de 91 pacientes con TBP incluidos en el estudio. Controles: pacientes con TBP. Casos: pacientes con TBP que desarrollaron daño hepático tras el tratamiento con INH..... | 35 |
| 3. Haplotipos más frecuentes encontrados en casos y controles de una población del noreste de México. Controles: pacientes con TBP. Casos: pacientes con TBP que desarrollaron hepatotoxicidad..... | 36 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| Å | Angstroms. |
| AC | Antes de Cristo |
| acHz | Acetil Hidracina. |
| ALT | Alanina aminotransferasa. |
| AST | Aspartato aminotransferasa. |
| ATP | Adenosín trifosfato. |
| CC | Carta consentimiento. |
| CPUs | Unidades Centrales de Procesamiento. (CPUs, del inglés Central Processing Unit) |
| CYP450 | Citocromos P450. |
| DILI | Daño hepático inducido por fármaco. (del inglés Drug-Induced Liver Injury) |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico. (del inglés Deoxyribonucleic Acid) |
| DOT | Tratamiento de observación directa. (del inglés Directly Observed Therapy) |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético. (del inglés Ethylene Diamine Tetra Acetic acid) |
| EHW | Equilibrio de Hardy-Weinberg. |
| ETM | Etambutol. |
| GST | Glutación S-Transferasa. |
| Hz | Hidracina. |
| IC | Intervalo de Confianza. |
| INH | Isoniacida. |
| kg | Kilogramo. |
| MAF | Frecuencia del alelo menos común. (del inglés Minor Allele Frequency) |
| MD | Dinámica Molecular. (del inglés Molecular dynamics) |
| mg | Miligramo. |

| | |
|------|---|
| mRNA | Ácido Ribonucleico mensajero. (del inglés Messenger Ribonucleic Acid) |
| Mtb | <u><i>Mycobacterium tuberculosis</i></u> . |
| mM | Milimolar. |
| NAT2 | N-Acetil transferasa 2. (GEN) |
| NAT2 | N-Arilaminatransferasa 2. (PROTEÍNA) |
| ns | Nanosegundos. |
| OMS | Organización Mundial de la Salud. |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud. |
| OR | Odds ratio. |
| pb | Pares de bases. |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa. (del inglés Polymerase Chain Reaction) |
| PDB | Base de datos de proteínas. (del inglés Protein Data Bank) |
| ps | Picosegundos. |
| RMSD | Desviación media cuadrática de posiciones atómicas. (del inglés Root-Mean Square Deviation of Atomic Positions) |
| RMSF | Desviación media cuadrática de fluctuaciones. (del inglés Root-Mean Square Fluctuations) |
| RNA | Ácido Ribonucleico. (del inglés Ribonucleic Acid) |
| mRNA | Ácido Ribonucleico mensajero. (del inglés messenger Ribonucleic Acid) |
| tRNA | Ácido Ribonucleico de transferencia. (del inglés Transfer Ribonucleic Acid) |
| RPM | Revoluciones por minuto. |
| SASA | Área acceso al solvente. (del inglés Surface Accessible Solvent Area) |
| SMZ | Sulfametoxazol. |
| SNP | Polimorfismos de un solo nucleótido. (del inglés Single Nucleotide Polymorphisms) |
| TBP | Tuberculosis Pulmonar. |

| | |
|-------|---|
| UDPGT | Uridinadifosfato Glucoroniltransferasa. |
| UV | Ultravioleta. |
| U/L | Unidades por Litro. |
| VIH | Virus de la Inmunodeficiencia Humana. |
| VMD | Visual Molecular Dynamics. |
| WT | Wild Type. |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis pulmonar

La tuberculosis pulmonar (TBP) es una patología causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). La infección ocurre por vía aérea al inhalar el agente causal suspendido en partículas de 1-5 μm en forma de aerosol (Gotas de Flügge) generadas al toser o estornudar de un individuo con la enfermedad pulmonar activa¹.

Debido a que el principal medio de transmisión es la vía aérea, los pulmones son el principal órgano afectado por esta micobacteria, los macrófagos alveolares son la primera línea de defensa en contra del agente infeccioso, quien una vez fagocitado por la célula del huésped, es capaz de sobrevivir en el fagosoma mediante la inhibición de enzimas lisosomales y proteínas involucradas en la maduración del fagosoma y desarrollar un cuadro crónico-inflamatorio² caracterizado por tos persistente, hemoptisis, dolor de pecho, fatiga, pérdida de peso, falta de apetito, escalofríos, fiebre y sudoración nocturna³.

Actualmente las opciones terapéuticas para tratar esta patología presentan hasta un 95% de efectividad cuando los pacientes cumplen tratamiento de observación directa (DOT, del inglés Directly Observed Therapy)⁴.

La adherencia al tratamiento farmacológico en la TBP es un factor determinante en su control y la efectividad del mismo⁵. Los factores involucrados en la falta de adherencia terapéutica incluyen la polifarmacia, tiempo de tratamiento prolongado, factores socio-económicos, la educación al paciente y toxicidad del tratamiento (Figura 1).

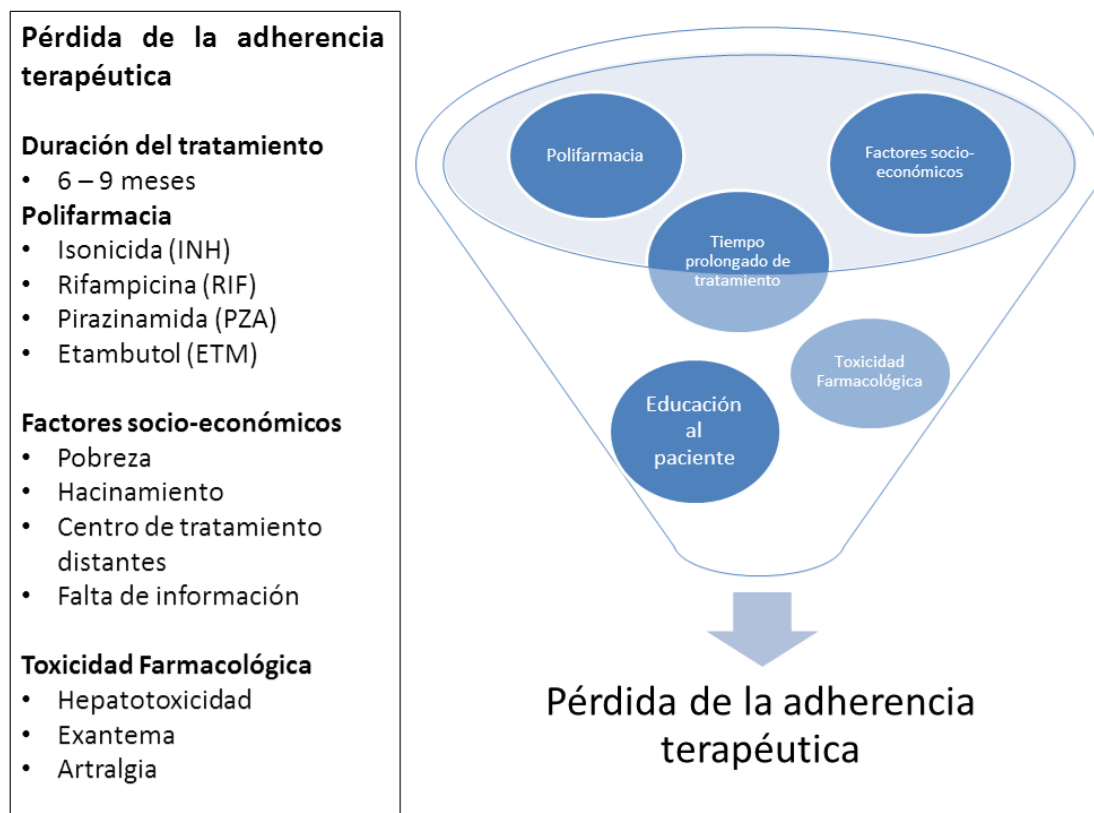


Figura 1: Factores involucrados en el tratamiento antituberculoso y la adecuada respuesta farmacológica.

El efecto adverso más común en la modificación e incumplimiento del régimen farmacológico antituberculoso es la hepatotoxicidad y a su vez el incumplimiento del tratamiento prescrito deriva en la resistencia bacteriana como un problema emergente el cual incrementa la morbilidad y mortalidad de las enfermedades infecciosas y aumenta los tiempos de hospitalización⁶.

1.2 Epidemiología

La TBP es una patología de alta prevalencia y un problema de salud pública a nivel mundial, es una de las primeras diez causas de muerte y la primera por enfermedades infecciosas. En el 2018 se reportaron 10.0 millones de nuevos casos y 1.5 millones de defunciones¹.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima un promedio de 282,000 nuevos casos en la región de las américas, México (28,000 casos estimados) es el tercer país con mayor número de casos estimados después de Brasil y Perú⁷.

En el 2014 la OMS propuso la estrategia '*Fin a la tuberculosis*' en la Asamblea Mundial de la Salud para reducir las muertes y nuevos casos por esta patología hasta en un 95 y 90% respectivamente para el año 2035. Se plantearon hitos para los años 2020, 2025, 2030 y 2035 presentados en la tabla 1⁸.

Tabla 1: Hitos propuestos por la OMS para disminuir la mortalidad e incidencia de la tuberculosis, propuestos en la estrategia mundial fin de la tuberculosis

| Hitos | Reducción de la tasa de incidencia | Reducción de la tasa de mortalidad |
|-------|------------------------------------|------------------------------------|
| 2020 | 20% | 35% |
| 2025 | 50% | 75% |
| 2030 | 80% | 90% |
| 2035 | 90% | 95% |

Sin embargo, los esfuerzos globales para cumplir con el primer hito para el año 2020 no parecen ser suficientes. La incidencia de TBP entre los años 2015-2018 solo se redujo un 6.3% y no un 20% como se estipuló en el primer

hito para el año 2020, mientras que la mortalidad se redujo un 11% del 35% planeado de acuerdo al reporte global de tuberculosis 2019¹.

La complejidad del tratamiento, los efectos adversos de este, así como las características propias del agente causal y huésped representan un gran reto para cumplimiento de las metas planteadas en la Asamblea Mundial de la Salud.

1.3 Mycobacterium tuberculosis y el tratamiento farmacológico

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) fue aislado por primera vez en el siglo XIX (1882) por Robert Koch, sin embargo el reporte más antiguo de la presencia de esta micobacteria data del año 3000 AC⁹. En el año 460 AC Hipócrates describió esta patología como una enfermedad de carácter mortal y la causa más frecuente de enfermedad entre adultos jóvenes¹⁰. Actualmente es la primera causa de muerte por enfermedades infecciosas¹¹.

En la década de 1930 con el descubrimiento de la penicilina y sulfonamidas, cambió el paradigma en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, porque en 1944 se comenzaría a trabajar con los fármacos estreptomycinina y ácido p-amino salicílico para el tratamiento de la tuberculosis. En 1952 se introdujo el fármaco isoniácida (INH) como fármaco antituberculoso y se implementó un régimen combinado de este con los fármacos estreptomycinina y ácido p-amino salicílico por 24 meses de tratamiento y fue hasta la década de 1980 cuando la duración del tratamiento se reduciría a 6 meses, por la implementación del esquema combinado de isoniácida (INH), rifampicina (RIF) y pirazinamida (PZA)¹².

Mtb es uno de los agentes infecciosos más difíciles de tratar, posee una pared celular compleja que contiene diversas macromoléculas como: peptidoglicano, arabinogalactano, lipoarabinomanosa, proteínas, ácidos micólicos y glucolípidos por lo que presentan una baja permeabilidad y le confiere una ventaja importante frente a muchos fármacos antibióticos que no

pueden cruzar esta barrera, sin embargo, la alta lipofilicidad permite a fármacos como RIF y fluoroquinolonas atravesar la compleja pared celular^{13,14}.

Por otra parte, los antibióticos presentan una mayor efectividad en tasa de división celular más dinámicas¹⁴. En el caso de *Mtb* la tasa de crecimiento es lenta lo que origina un periodo de tratamiento extenso, los individuos que reciben el tratamiento deben comprometerse a completar el régimen terapéutico para asegurar la eficacia terapéutica del tratamiento. Sin embargo, como se mencionó previamente existen otros factores asociados con la falta de adherencia al tratamiento. (Figura 1).

1.4 Polimorfismos genéticos

La información genética se transmite a través de la herencia del Ácido Desoxirribonucleico (DNA, del inglés Deoxyribonucleic acid), un polímero bicatenario de los nucleótidos: monofosfato de dexosadenosina (A), monofosfato de dexosiguanosina (G), monofosfato de dexosicitidina (C), monofosfato de desoxitimidina (T), que contiene la información necesaria para la vida mediante la síntesis de proteínas. Cambios en la secuencia en el DNA se denominan polimorfismos si están presentes en más del 1% de la población y pueden presentarse como inserciones/deleciones, duplicaciones, repeticiones en tándem y cambio de un solo nucleótido¹⁵.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés Single-Nucleotide Polymorphism) en la secuencia codificante tienen un efecto en la función del gen que codifican, estos polimorfismos pueden resultar en un cambio de aminoácido (sustituciones no sinónima), si el aminoácido no comparte las propiedades fisicoquímicas y estéricas con el aminoácido silvestre, la proteína sufre un cambio en sus estructura modificando las interacciones intermoleculares presentes en la macromolécula (puentes de

hidrógeno, puentes salinos, Van der Waals) comprometiendo la estabilidad de la misma y/o su actividad proteica¹⁶. (Figura 2).

Por otra parte, las mutaciones sinónimas (sin cambio de aminoácido) en la secuencia codificante modifican la lectura del código genético durante el proceso de traducción, en la cual la estabilidad del RNA mensajero (mRNA del inglés messenger Ribonucleic acid) y/o el tiempo de síntesis de la cadena polipeptídica pueden verse afectados.

Cuando no se encuentran en la región codificante, los SNPs pueden interferir con procesos de regulación de la expresión génica¹⁷. (Figura 2).

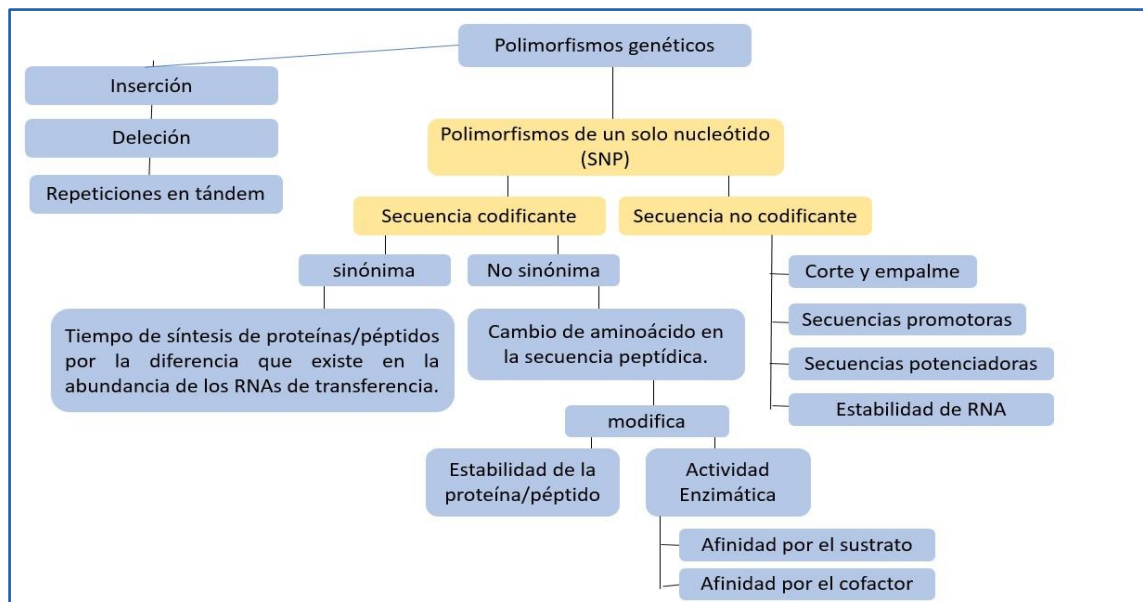


Figura 2: Implicación de los polimorfismos genéticos tipo SNP en la síntesis proteica y actividad enzimática.

1.5 El daño hepático y el tratamiento antituberculoso.

El daño hepático inducido por el uso de fármacos es una de las principales complicaciones asociadas a la discontinuación de fármacos en fases clínicas y preclínicas¹⁸, a su vez es difícil predecir la aparición de este efecto adverso debido a que la información recabada de estudios celulares y

animales no es suficiente para predecir este efecto adverso debido a la diversidad génica, metabólica e inmunológica que existe incluso entre individuos de la misma especie^{19,20}.

El tratamiento antituberculoso es uno de los regímenes farmacológicos con mayor número de eventos relacionados a lesiones hepáticas^{21,22}, en un rango del 2-28% dependiendo de la población estudiada²³ y hasta en un 22% en pacientes que recibieron monoterapia con INH^{24,25}, en el tratamiento de la tuberculosis latente. El amplio rango de incidencia de daño hepático puede ser adjudicado a la diversidad genética entre las poblaciones.

La presencia de polimorfismos en los genes de las enzimas responsables del metabolismo hepático es un reflejo de la presión selectiva a la que las poblaciones fueron sometidas, debido a esto la variabilidad étnica imposibilita la extrapolación de datos farmacogenómicos entre poblaciones con lo cual queda explícita la necesidad de conocer la prevalencia de estos marcadores en las poblaciones²⁶.

El metabolismo hepático es llevado a cabo con el propósito de eliminar xenobióticos que pueden resultar tóxicos para el organismo, entre las enzimas encargadas de llevar a cabo estas reacciones de hidrólisis y conjugación se encuentran: *CYP450* (Citocromo P450), *GST* (Glutación S-Transferasa), *UDPGT* (UDP Glucuronil Transferasa) y *NAT2* (N-Arilamina Transferasa 2).

Polimorfismos genéticos en estos genes han sido propuestos previamente en la literatura como factores de riesgo en el desarrollo de daño hepático inducido por fármacos (DILI, del inglés Drug-Induced Liver Injury)²⁷. Un cambio en la actividad enzimática por el efecto de polimorfismos genéticos en los genes que codifican a las enzimas hepáticas compromete la capacidad de detoxificación de xenobióticos y representan un amplio campo de estudio en el ámbito farmacogenómico.

1.6 N-acetiltransferasa 2 (NAT2)

NAT2 es un gen ubicado en el brazo corto del cromosoma 8, constituido por 2 exones, separados por 1 intrón de 8600 pb. El exón 1 es una región de 100 pb de longitud y de función desconocida, mientras la región codificante pertenece al exón 2 y tiene una longitud de 870 pb^{28,29}, la cual codifica a la enzima N-Arilamina transferasa 2 (*NAT2* EC 2.3.1.5) de 290 aminoácidos responsable de la acetilación y detoxificación de xenobióticos mediante la adición de un grupo acetil que permiten su eliminación por vía renal³⁰.

La proteína presenta variaciones funcionales relacionadas a la presencia de polimorfismos tipo SNP en su secuencia codificante, donde siete de ellos se han asociado principalmente a este fenómeno: rs1801279, rs1041983, rs1801280, rs1799930, rs1799929, rs1208 y rs1799931³¹.

Los SNPs rs1041983 y rs1799929 presentan un cambio de nucleótido de Citosina por Timina (C/T) en la posición 282 y 481 de la región codificante de *NAT2* y son sinónimas (Y94Y y L161L respectivamente), mientras que los SNPs rs1801279, rs1801280, rs1799930, rs1208 y rs1799931 presentan un cambio de nucleótido en las posiciones 191 (G/A), 341 (T/C), 590 (G/A), 803 (A/G) y 857 (G/A) y presentan los cambios de aminoácidos 64 (R/Q), 114 (I/T), 197 (R/Q), 268 (L/R) y 286 (G/E) respectivamente³¹. (Figura 3).

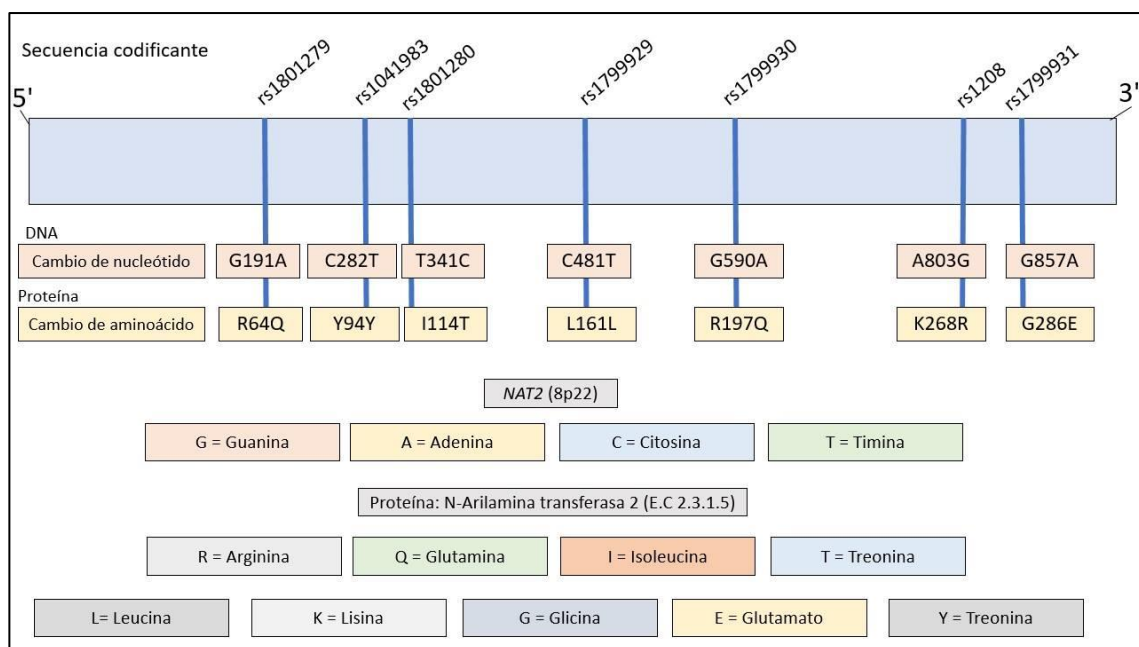


Figura 3: Secuencia codificante y polimorfismos de un solo nucleótido del gen *NAT2*.

La genotipificación de estos SNPs permite determinar la capacidad enzimática de *NAT2*, pues la variabilidad farmacocinética está relacionada con la combinación de los SNPs (alelos) en el mismo cromosoma bajo una unidad denominada haplotipo³². Debido a que es un gen altamente polimórfico presenta más de 100 variantes tipo SNP y solo algunas son determinantes en el fenotipo enzimático denominándose SNPs líderes^{33,34}. (Tabla 2).

Tabla 2: Características de las variantes haplotípicas de *NAT2*.

| Haplotipo | Fenotipo | SNP líder | Tipo de variante |
|--|----------|------------------|--|
| NAT2*4 (Silvestre o wild type) | Rápido | No aplica | Gen silvestre sin cambios polimórficos |
| NAT2*5 (NAT2*5A a NAT2*5Z) | Lento | rs1801280 | T341C , mutación no sinónima I114T |
| NAT2*6 (NAT2*6A a NAT2*6V) | Lento | rs1799930 | G590A , mutación no sinónima R197Q |
| NAT2*7 (NAT2*7A a NAT2*7G) | Lento | rs1799931 | G857A , mutación no sinónima G286E |
| NAT2*11 (NAT2*11A a NAT2*11B) | Rápido | rs1799929 | C481T , mutación sinónima L161L |
| NAT2*12 (NAT2*12A a NAT2*12P) | Rápido | rs1208 | G803A , mutación no sinónima K268R |
| NAT2*13 (NAT2*13A a NAT2*13G) | Rápido | rs1041983 | C282T , mutación sinónima Y94Y |
| NAT2*14 (NAT2*14A a NAT2*14L) | Lento | rs1801279 | G191A , mutación no sinónima R64Q |

Sim E., Laurieri N. Arylamines transferases in health and disease: From pharmacogenetics to drug discovery and diagnosis. World scientific publishing Co. Pte. Ltd. 2018 ISBN: 9789813232006³⁴.

Se han definido 3 fenotipos de acetilación de acuerdo a la velocidad de acetilación de la enzima. El fenotipo de acetilación lento se define por una disminución en la capacidad metabólica por la presencia de dos haplotipos lentos, debido a que es un sistema codominante (*NAT2*5*, *NAT2*6*, *NAT2*7* y *NAT2*14*), el fenotipo de acetilación intermedio es definido a su vez por la presencia de un haplotipo lento y otro rápido, mientras que el fenotipo rápido se define por la ausencia de haplotipos lentos, es decir la presencia de haplotipos rápidos (*NAT2*4*, *NAT2*11*, *NAT2*14* y *NAT2*13*) (Tabla 3).

Tabla 3: Definición de acetiladores lentos, intermedios y rápidos.

| Acetiladores lentos | | | |
|--|-------------------|--|-------------------|
| Fenotipo: Lento | | Definición: Dos haplotipos lentos | |
| Combinaciones | | | |
| <i>NAT2*5/5</i> | <i>NAT2*5/6</i> | <i>NAT2*5/7</i> | <i>NAT2*5/14</i> |
| <i>NAT2*6/6</i> | <i>NAT2*6/7</i> | <i>NAT2*6/7</i> | <i>NAT2*6/14</i> |
| <i>NAT2*7/7</i> | <i>NAT2*7/14</i> | <i>NAT2*14/14</i> | |
| Acetiladores Intermedios | | | |
| Fenotipo: Intermedio | | Definición: Un haplotipo lento y uno rápido | |
| Combinaciones | | | |
| <i>NAT2*4/5</i> | <i>NAT2*4/6</i> | <i>NAT2*4/7</i> | <i>NAT2*4/14</i> |
| <i>NAT2*11/5</i> | <i>NAT2*11/6</i> | <i>NAT2*11/7</i> | <i>NAT2*11/14</i> |
| <i>NAT2*12/5</i> | <i>NAT2*12/6</i> | <i>NAT2*12/7</i> | <i>NAT2*12/14</i> |
| <i>NAT2*13/5</i> | <i>NAT2*13/6</i> | <i>NAT2*13/14</i> | <i>NAT2*13/14</i> |
| Acetiladores Rápidos | | | |
| Fenotipo: Rápido | | Definición: Ausencia de haplotipos lentos | |
| Combinaciones | | | |
| <i>NAT2*4/4</i> | <i>NAT2*4/11</i> | <i>NAT2*4/12</i> | <i>NAT2*4/13</i> |
| <i>NAT2*11/11</i> | <i>NAT2*11/12</i> | <i>NAT2*11/13</i> | <i>NAT2*12/12</i> |
| <i>NAT2*12/13</i> | <i>NAT2*13/13</i> | | |
| PharmGKB summary: very important pharmacogene information for N-acetyltrasnferase 2. Pharmacogenetics and genomics. 2014. McDonagh Ellen M., Boukovala Sotiria, Aklullu Eleni, Hein David W., Altman Russ B., Klein Teri ³⁵ . | | | |

1.7 Metabolismo de INH

Los mecanismos exactos de la toxicidad hepática por el tratamiento antituberculoso de primera línea no son del todo conocidos, sin embargo, la contribución del metabolismo hepático en el desarrollo de este efecto adverso es uno de los principales factores de acuerdo con los mecanismos propuestos en la literatura^{20,36}.

La enzima *NAT2* es parte de la fase 2 del metabolismo hepático encargada de la detoxificación por medio de acetilación de hidracinas y arilaminas para la eliminación de estas sustancias del organismo³⁷. El fármaco

INH es un sustrato de esta enzima y puede ser acetilado antes o después de ser hidrolizado a hidracina (Hz) dando pie a la síntesis de la molécula acetil Hidracina (acHz), estos dos metabolitos han sido propuestos como los metabolitos responsables del daño hepático inducido por INH los cuales deben ser nuevamente acetilados para formar diacetil Hidracina, que es más soluble, menos tóxica y se elimina vía renal³⁸.

De acuerdo con Boelsterli y colaboradores, Hz es una molécula pequeña nucleófila que puede reaccionar con intermediarios cetoácidos del ciclo de Krebs interfiriendo con una vía metabólica fundamental en la fosforilación oxidativa, incluso se ha observado la capacidad de esta molécula de inhibir el complejo 2 succinato deshidrogenasa en la cadena transportadora de electrones²⁰. La disminución en la fosforilación oxidativa y por tanto de ATP guía a la célula a muerte celular mediante la liberación del citocromo C.

Por otra parte, acHz es metabolizada por la familia de citocromos p450, dando pie a la generación de Diacénos e Hidrazonas mediante N-hidroxilación, los cuales son altamente reactivos e interaccionan con residuos de lisina de macromoléculas proteicas e inducen la activación del sistema inmune mediante la formación de haptenos y neoantígenos³⁶.

Estos metabolitos también pueden inhibir de forma covalente isoenzimas de la familia p450. (Figura 4).

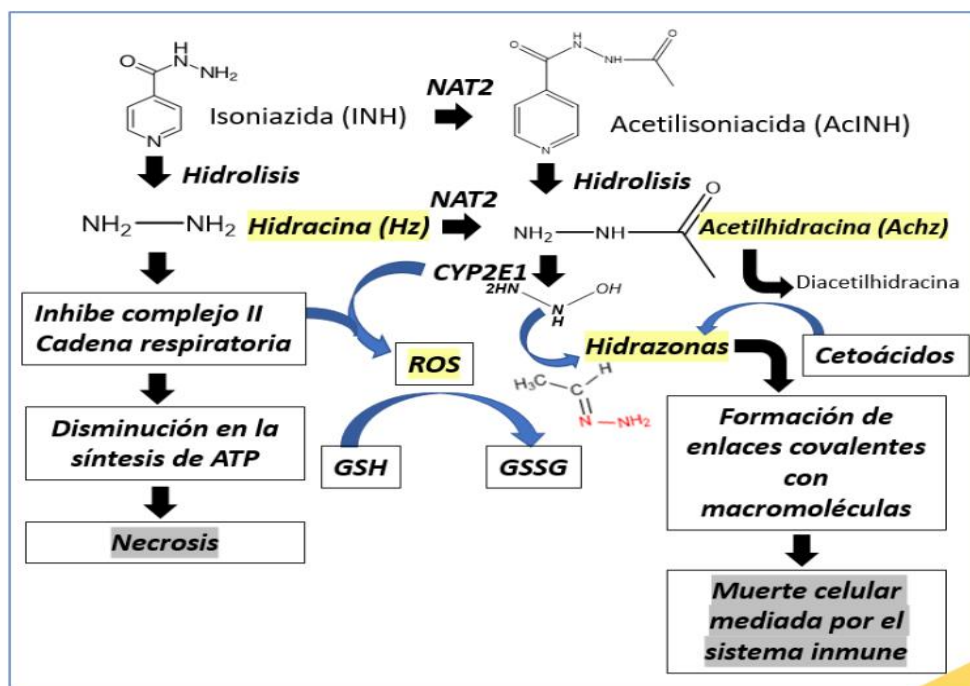


Figura 4: Mecanismo hepatotóxico propuesto para el desarrollo del daño hepático inducido por INH.

1.8 Dinámica Molecular

La dinámica molecular (MD, del inglés Molecular Dynamics) es una herramienta de simulación computacional que permite evaluar el comportamiento y movimiento de los átomos a través del tiempo (basados en la segunda ley de la termodinámica de Newton), que nos proveen información de cambios conformacionales (RMSD, del inglés Root-Mean Square Deviation of atomic positions), fluctuaciones (RMSF, del inglés Root-Mean Square of Fluctuations), el área de acceso a solvente (SASA del inglés Surface Accessible Solvent Area), etc³⁹.

Esta herramienta es de amplia utilidad en el estudio del comportamiento fisicoquímico de macromoléculas y su dinámica, lo que permite el estudio de sistemas biológicos con interés biomédico para conocer el comportamiento de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos⁴⁰.

Las herramientas bioinformáticas de dinámica molecular son un campo emergente en el estudio de la estructura y función proteica, a pesar de haberse desarrollado a finales de los 70s y representan una herramienta útil para el estudio y análisis del efecto de cambios de aminoácidos en macromoléculas proteicas^{41,42}. Entre los análisis computacionales que se pueden realizar a partir de la trayectoria simulada se encuentran:

- **Desviación media cuadrática de posiciones atómicas (RMSD):**

Es la desviación de las posiciones atómicas entre los átomos de dos estructuras macromoleculares dadas.

- **Desviación media cuadrática de fluctuaciones (RMSF):**

Es la desviación en la media de las fluctuaciones de los átomos de una estructura macromolecular dada.

- **Área accesible al solvente (SASA):**

Es la medida del área en una estructura macromolecular a la que el solvente tiene acceso.

- **Distancia entre átomos:**

Es la medida de la distancia entre dos componentes de una estructura macromolecular.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Actividad enzimática de los haplotipos lentos

Zhang y colaboradores en el 2007 mediante mutagénesis sitio dirigida obtuvieron 10 variantes (siete de ellas fueron evaluadas en los pacientes incluidos en este estudio) de la secuencia codificante *NAT2*4* previamente insertada en el vector pcDNA 5/FRT, el cual se expresó en la línea celular COS-1 (línea celular similar a fibroblastos). La actividad enzimática de cada una de estas variantes fue valorada utilizando como sustrato al sulfametoxazol (SMZ). Las variantes no sinónimas: rs1801279, rs1801280, rs1799930, disminuyeron la actividad enzimática hasta en un 85%, mientras que rs1799931 en un 50%⁴³.

Por otra parte, en las variantes rs1208, rs1041983 y rs1799929 no se encontraron diferencias significativas en la capacidad de N-acetilación respecto a la WT (del inglés Wild Type).

2.2 Efecto del cambio de aminoácido en la estructura enzimática

Walraven y colaboradores en el 2008 y Rajasekaran y colaboradores en el 2011 describieron el efecto del cambio de aminoácido de las variantes no sinónimas rs1801279 (R64Q), rs1801280 (I114T), rs1799939 (R197Q) y rs1799931 (G286E)^{44,45}.

En el caso de la variante rs1801280 característico del haplotipo *NAT2*5*, el cambio del aminoácido isoleucina por treonina en la posición 114 (I114T) de la secuencia proteica conlleva a una pérdida de interacciones hidrofóbicas con los residuos de aminoácido leucina (L21 y L24) en el dominio 1, así como con el

aminoácido fenilalanina (F84) y valina (V112) en el dominio 2 debido la sustitución por un residuo aminoácido polar como treonina, sin embargo el efecto de esta pérdida de interacciones hidrofóbicas no se ha definido en un efecto en la estructura terciaria⁴⁵.

Mientras que en el caso de la variante rs1799930 característico del haplotipo *NAT2**6 ocurre un cambio del aminoácido arginina por glutamina en la posición 197 de la secuencia de la proteína (R197Q) dando lugar a la pérdida de las interacciones electroestáticas con los aminoácidos metionina (M105) y el ácido glutámico (E195) por la sustitución a glutamina afectando la estructura secundaria de la proteína^{44,45}.

El cambio de glicina por ácido glutámico (G286E) en la variante rs1799931 característico del haplotipo *NAT2**7 modifica estéricamente el sitio activo debido a que el ácido glutámico es un residuo mucho más grande que glicina por lo que modifica la cola C-terminal adyacente al sitio activo, alterando el acceso al mismo^{44,45}.

En la variante rs1801279 característico del haplotipo *NAT2**14, ocurre un cambio de arginina por glutamina en la posición 64 (R64Q), donde se pierde un puente salino con el ácido glutámico en la posición 38 (E38) altamente conservado e importante en el plegamiento de la enzima⁴⁴.

Sin embargo, el estudio de estas variantes en forma combinada con otras variantes dentro del mismo gen no se ha llevado a cabo y podría dar lugar a un efecto aditivo. La base de datos del comité de nomenclatura de NATs reporta la combinación de variables I114T (rs1801280) y R197Q (rs1799930) en los haplotipos: *NAT2**5J, *NAT2**5P, *NAT2**5Q, *NAT2**5R, *NAT2**5U y la combinación de las mutaciones I114T (rs1801280) y G286E (rs1799931) en los haplotipos *NAT2**5KA, *NAT2**5S, *NAT2**5TA y *NAT2**5VA. El fenotipo reportado para estas variantes es acetilación lenta³³.

2.3 Susceptibilidad al daño hepático por el tratamiento antituberculoso

Zhang y colaboradores en el 2018 publicaron un metaanálisis de los artículos científicos recopilados de la base de datos pubmed hasta el 31 de diciembre del 2017, su análisis incluye 37 estudios científicos con un total de 1527 casos y 7184 controles, donde los controles son pacientes con TBP y los casos aquellos que presentaron hepatotoxicidad por el tratamiento antituberculoso. Se excluyeron los estudios en donde los controles fueran individuos sanos, así como los estudios que no incluyeron acetiladores lentos, o una limitada distribución de haplotipos de *NAT2*⁴⁶.

La distribución geográfica incluida fue amplia y obtuvieron un Odds Ratio (OR) de 3.15 (IC 95% 2.58-3.84). Los grupos de mayor riesgo tenían los haplotipos lentos *NAT2**6/7, y *NAT2**5/6⁴⁶.

Dado a la necesidad de estudios farmacogenómicos en cada población, en el 2019 se publicaron estudios caso-control que relacionan los haplotipos lentos de *NAT2* con el riesgo al desarrollo de daño hepático en Brasil por Araujo-Mariz y colaboradores con 173 individuos genotipificados, en Indonesia por Yuliwulandari y colaboradores con 310 individuos genotipificados y China por Lu y colaboradores con 705 individuos genotipificados con buenas correlaciones entre la relación del genotipo con el desarrollo del efecto adverso⁴⁷⁻⁴⁹.

2.4 Genotipos *NAT2* en población Mexicana

Los reportes sobre el estudio de las frecuencias haplotípicas de *NAT2* en México son pocos, el trabajo de tesis de Maestría del MVZ Eduardo Belarmino Pérez Medina en el 2005, el cual incluye la genotipificación de 104 individuos sanos en el noreste de México⁵⁰ y los trabajos de Díaz-Molina y colaboradores

en el 2008 con 25 individuos sanos de Mexicali⁵¹, Taja-Chayeb y colaboradores en el 2012 con 118 individuos sanos y 132 con distintos tipos de cáncer de una población en la región del centro de México⁵² y Salazar-González y colaboradores en el 2014, con 121 individuos sanos y 40 pacientes con TBP de San Luis Potosí⁵³, de los cuales podemos decir que los haplotipos más prevalentes son: *NAT2*4*, *NAT2*5B*, *NAT2*6A*, *NAT2*7B* y que el porcentaje de acetiladores lentos oscila en el rango de 31-40%, los acetiladores intermedios en el rango de 32-50% y los acetiladores rápidos en el rango de 8-19%⁵⁰⁻⁵⁵.

Por otra parte, no hay estadísticas en México sobre la incidencia del daño hepático relacionado al tratamiento de primera línea anti-tuberculoso.

2.5 Utilidad clínica

En el 2013, *Azuma* y colaboradores⁵⁶ realizaron un estudio comparativo en población Japonesa con el régimen estándar antituberculoso, el cual incluye 5 mg/kg de INH contra un régimen guiado por los genotipos de *NAT2*, el cual incluye 7.5 mg/kg en pacientes acetiladores rápidos, 5 mg/kg para pacientes acetiladores intermedios y 2.5 mg/kg para pacientes acetiladores lentos. El grupo con el tratamiento estándar desarrolló un 78% de eventos INH-DILI (Daño hepático inducido por isoniácida, del inglés Isoniazid Drug-Induced Liver Injury) en los pacientes acetiladores lentos, mientras que en el grupo con el tratamiento guiado por el genotipo de *NAT2* no se presentó daño hepático asociado al uso de fármacos antituberculosos. El estudio incluyó un total de 173 pacientes⁵⁶.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

El estudio de 7 SNPs de la región codificante de *NAT2* propuestos por el *comité de nomenclatura de los NATs* es importante y representa una oportunidad para establecer criterios y metodologías que permitan el ajuste de la dosis para una respuesta terapéutica adecuada, de manera que los individuos que presentan menor capacidad de acetilación por la presencia de SNPs en la secuencia genética de *NAT2* no padezcan efectos adversos, como la hepatotoxicidad que pueda comprometer la adherencia al régimen terapéutico, así mismo asegurar la dosis optima en el tratamiento de los pacientes con el fenotipo de acetilación rápido con el propósito de evitar el desarrollo de la resistencia bacteriana.

La falta de estudios farmacogenómicos sobre los efectos adversos del tratamiento antituberculoso en la población del noreste de México plantea la necesidad de un estudio que permita conocer la frecuencia de los haplotipos *NAT2* y el impacto del fenotipo acetilador lento en esta población.

3.2 Hipótesis

Los pacientes que presentan los haplotipos lentos (*NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7, y *NAT2**14) tendrán mayor riesgo de desarrollar daño hepático inducido por el tratamiento con INH en pacientes con tuberculosis pulmonar.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo General

Determinar la presencia de haplotipos lentos como riesgo al desarrollo de daño hepático inducido por INH en pacientes con TBP.

3.3.2 Objetivos específicos

- Seleccionar los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión.
- Extraer el DNA genómico de pacientes del grupo control y el grupo caso.
- Determinar la frecuencia alélica, genotípica y haplotípica de la población mestiza mexicana del noreste de México de los SNPs rs1801280, rs1041983, rs1801280, rs1799929, rs1799930, rs1208 y rs1799931.
- Inferir los haplotipos de los pacientes mediante las frecuencias alélicas obtenidas en el software SHEsis⁵⁷.
- Determinar el efecto en la estructura de *NAT2* de los SNPs líderes de mayor prevalencia.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material Biológico

1. DNA genómico aislado a partir de muestras sanguíneas.

4.1.2. Equipo

1. Real-Time PCR 7500 system. ***Applied Biosystems.***
2. Z100A Clinical centrifuge. ***LabNet.***
3. Incubadora VorTemp 56. ***LabNet.***
4. Microcentrifuga 5418. ***Eppendorf.***
5. Vortex Mixer. ***LabNet.***
6. NanoDrop 2000 Spectrophotometer. ***ThermoScientific.***
7. UVC/T-AR DNA/RNA UV-Cleaner box. ***BioSan.***
8. Cluster de supercomputo. **Laboratorio BMD. CINVESTAV IPN.**

4.1.3 Plataformas bioinformáticas.

1. Epi Info. **Centers for Disease Control and Prevention.**
2. TaqMan Genotyper 1.6V. **Applied Biosystems.**
3. SHEsisPLUS. **Bio-X Center.**
4. GROMACs. **University of Groningen.**

4.1.4 Plataformas estadísticas

1. Prism8. **Graphpad.**
2. SigmaPLOT. **Systat Software.**

4.1.5 Reactivos

1. Kit para extracción de DNA genómico, FlexiGene DNA. **QIAGEN.**
2. Primers y Sondas TaqMan para PCR en tiempo-Real. **Applied Biosystems.**
3. TaqMan Universal PCR Master Mix. **Applied Biosystems.**

4.1.6 Materiales

1. Tubos. **Vacutainer**
2. Micropipetas de 1,10, y 100 microlitros.
3. MicroAmp, Film adhesivo para placas de reacción. **Applied Biosystems.**
4. MicroAmp, Placa de reacción de 96 pocillos. **Applied Biosystems.**

4.1.7 Ubicación

1. Centro de Investigación Biomédica del Noreste
Calle 2 de abril 501, esq. San Luis Potosí, Col. Independencia, C.P.
64720, Monterrey, Nuevo León, México.
2. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad
Monterrey. Vía del Conocimiento 201, Parque de Investigación e
Innovación Tecnológica (PIIT), 66600 Apodaca, Nuevo León, México.

4.2 Métodos

4.2.1 Pacientes del estudio

91 Pacientes con TBP de las clínicas 2, 3, 5, 6, 7, 15, 24, 27, 31, 33, 35, 36, 39, de los cuales 7 son casos debido a que desarrollaron hepatotoxicidad por el tratamiento de primera línea y el resto (84 individuos) no desarrollaron hepatotoxicidad durante el tratamiento y se consideraron como controles, ambas poblaciones son derechohabientes del IMSS que acuden a la Unidad de Medicina Familiar de adscripción localizada en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México.

4.2.2 Criterios de Inclusión y Exclusión

Los pacientes con TBP fueron diagnosticados por estudios clínicos de imagen (rayos X de tórax) y cultivo específico para *Mtb*, en forma previa firmaron carta de consentimiento (CC). Todos los pacientes iniciaron tratamiento como marca la norma oficial mexicana NOM-006-SSA2-2013 para la prevención y control de la tuberculosis, con vigilancia estricta de

administración del esquema. Se descartó hepatopatías pre-existentes por ingesta de alcohol e infecciones virales, mediante el diagnóstico clínico y observación médica.

Hepatopatías como:

- Hepatitis alcohólica
- Esteatosis
- Cirrosis biliar
- Cirrosis hepática

Infecciones virales como:

- Virus A, B y C
- VIH
- Mononucleosis infecciosa
- Citomegalovirus
- Virus Epstein-Barr

Otras patologías como:

- Miocarditis
- Insuficiencia cardíaca
- Infarto agudo al miocardio
- Tumores
- Pancreatitis
- Enfermedad de Wilson

3.2.2 Criterio de daño hepático

Los valores de referencia para Aspartato transaminasa (AST) en sangre en hombres es de 8 a 40 U/L y de 6 a 34 U/L en mujeres, mientras que los valores de Alanina transaminasa (ALT) en hombres oscilan en un rango de 10 a 40 U/L y 7 a 35 U/L en mujeres. El grupo de casos incluye a los individuos con valores de transaminasas que superen al menos dos veces el límite superior

normal y/o presenten la sintomatología del daño hepático que se caracteriza por: ictericia, dolor en la parte inferior del abdomen, hinchazón en piernas, tobillos y abdomen, orina de color oscuro, heces pálidas y fatiga crónica⁵⁸.

4.2.4 Protocolo de extracción de DNA genómico

La extracción del DNA se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica, aislados mediante el kit de reactivo FlexiGene DNA QIAGEN.

1. Se colectan 5 mL de sangre periférica en tubos con EDTA.
2. Centrifugar el tubo con 5 mL de sangre periférica recolectada.
3. Recoger la capa de glóbulos blancos, y transferir a tubos de 1.5 mL.
4. Añadir buffer de lisis hasta 1.5 mL para la disrupción de glóbulos rojos.
5. Agitar a 100 rpm por 10 minutos sin temperatura.
6. Centrifugar 3000 rpm/3 minutos.
7. Decantar el sobrenadante.
8. Disgregar el botón de glóbulos blancos.
9. Agitar en el agitador tipo vórtex.
10. Añadir buffer de lisis nuevamente.
11. Agitar en el agitador tipo vórtex.
12. Centrifugar 3000 rpm/3 minutos.
13. Decantar.
14. Añadir buffer de desnaturalización.
15. Mezclar en el agitador tipo vórtex.
16. Añadir Proteasa.

17. Colocar en baño de temperatura a 65°C por 30 minutos.
18. Añadir etanol 100% frío.
19. Centrifugar 10 000 rpm/10 minutos.
20. Lavado con etanol a 70%.
21. Mezclar en el agitador tipo vórtex.
22. Centrifugar 10 000 rpm/10 minutos.
23. Lavado con Etanol a 70%.
24. Mezclar en el agitador tipo vórtex.
25. Centrifugar 10 000 rpm/10 minutos.
26. Decantar.
27. Añadir buffer de resuspensión.

4.2.5 Genotipificación

La genotipificación fue realizada mediante discriminación alélica mediante PCR en tiempo real por sondas TaqMan de 7 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): rs1801279, rs1041983, rs1801280, rs1799929, rs1799930, rs1208, y rs1799931.

1. Se esteriliza el área de trabajo mediante aplicación de luz UV por 15 min.
2. Se agitan las muestras de DNA a 100 rpm/40 min sin temperatura.
3. Centrifugar 1000 rpm/30 segundos.
4. Depositar 4 µL del preparado MasterMix/Sonda y 1 µL de ADN en los pocillos.
5. Cubrir con protector de placa de reacción.
6. Llevar acabo la reacción de PCR.

Tabla 4: Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa.

| Componentes de MasterMix/Sonda | |
|---|---------------------------------------|
| Taqman Master mix para genotipificación (2X) | |
| ADN polimerasa UP. (Ultra Pura del inglés Ultra Pure) | dNTPs. (desoxinucleótidos trifosfato) |
| Marcador de fluorescencia interna (ROX) | MgCl (Cloruro de Magnesio) |
| Sondas Taqman para los SNPs: rs1801279, rs1041983, rs1801280, rs1799930, rs1799929, rs1208, y rs1799931 | |

Tabla 5: Condiciones de reacción.

| Condiciones de PCR en tiempo real | | |
|--|-------------------------------|-----------------------|
| Pre-lectura de la PCR. | | 60°C por 30 segundos |
| Desnaturalización inicial | | 95°C por 10 minutos. |
| 50 ciclos de reacción | Desnaturalización | 95°C por 15 segundos. |
| | Alineación y extensión | 65°C por 1 minuto. |
| Post-lectura de la PCR. | | 60°C por 30 segundos. |
| Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen de reacción de 5 µL en una placa de reacción de 96 pocillos. | | |

4.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se realizó la discriminación alélica mediante PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) en tiempo real. Se utilizaron 7 sondas TaqMan diseñadas por *ThermoFisher Scientific®* para la detección específica de cada uno de los 7 SNPs determinados en este proyecto.

Se utilizó el software TaqMan Genotyper 1.6V de *Applied biosystems®* para el análisis de datos de genotipificación SNP (Figura 5). Las reacciones se llevaron a cabo en una placa de 96 pocillos, 91 de ellos fueron las muestras de los individuos incluidos en el estudio, 2 controles negativos y 3 muestras control con un genotipo conocido.

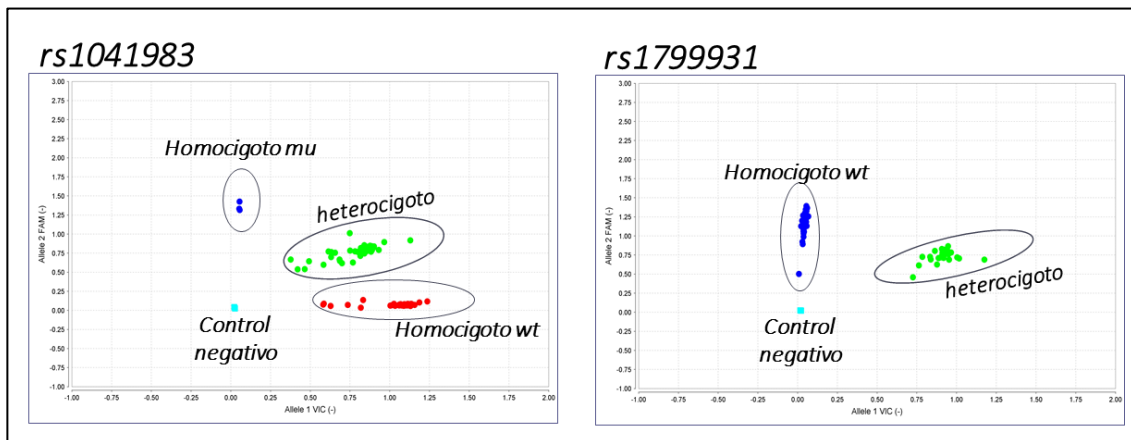


Figura 5: Gráficos obtenidos en la determinación génica de las muestra evaluadas

4.2.7 Dinámica molecular

Los estudios de dinámica molecular fueron realizados en colaboración con el Laboratorio de Diversidad Molecular en el Instituto Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Monterrey.

Se realizaron los siguientes modelos de acuerdo con la prevalencia de estos en los haplotipos más frecuentes en la población. Se incluyeron modelos que presentan la combinación de dos SNPs líderes en la disminución de la actividad enzimática de *NAT2* en la misma secuencia proteica debido a su alta prevalencia en el grupo de casos:

- WT – Sin cambio de aminoácido.
- (a) I114T – Cambio de isoleucina por treonina en la posición 114.
- (b) R197Q – Cambio de arginina por glutamina en la posición 197.
- (c) G286E – Cambio de glicina por ácido glutámico en la posición 286.
- (ab) I114T +R197Q – Incluye el cambio de isoleucina por treonina en la posición 114 y el cambio de arginina por glutamina en la posición 197.
- (ac) I114T +G286E – Incluye el cambio de isoleucina por treonina en la posición 114 y el cambio de glicina por ácido glutámico en la posición 286.

La simulación comprendió un tiempo total de 6000ns, es decir 1000ns por modelo lo que equivale a 114 Unidades Centrales de Procesamiento (CPUs, del inglés Central Processing Unit), con una productividad de 18.8 ns por día mediante el programa GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations).

1. La estructura proteica de *NAT2* (Código 2PFR) utilizada fue obtenida en alta resolución (1.92 Å), de la base de datos RCSB PDB [rcsb.org/structure/2PFR]
2. A partir del archivo de la estructura cristalizada de *NAT2* se trabajó con la proteína completa (290 aminoácidos) y se removieron iones, la coenzima A, y otras moléculas incluidas en el archivo original.
3. Se obtuvieron los modelos (a) I114T, (b) R197Q, (c) G286E, (ab) I114T+R197Q, (ac) I114T+R286Q mediante la extensión “Mutar residuo” del programa ‘Visual Molecular Dynamics (VMD)’.
4. Las cadenas laterales se arreglaron mediante el servidor WHATIF [Swift.cmbi.umn.nl]
5. La topología fue generada para los 6 modelos (incluyendo la WT como referencia) mediante el programa GROMACS utilizando el campo de fuerza OPLS-AA que considera todos los átomos.
6. La proteína es colocada en una celda computacional, y se afora con moléculas de agua (modelo de cuatro puntos: TIP4P)
7. Se añaden iones (NaCl) a concentración 100 mM mediante la herramienta Genion de GROMACS.
8. La estructura de la proteína es relajada mediante un proceso de minimización de energía mediante la herramienta grompp, por un tiempo de 100 ps hasta lograr el equilibrio, con el propósito de evitar choques estéricos o geometría inapropiada.

9. El sistema es equilibrado bajo los parámetros de número constante de partículas, volumen y temperatura mediante la herramienta grompp, hasta su equilibrio por un tiempo de 100 ps y temperatura de 37°C (310.15 K)
10. El sistema es equilibrado bajo los parámetros de número constante de partículas, presión y temperatura mediante la herramienta grompp, hasta el equilibrio por un tiempo de 100 ps y presión de 1 bar.
11. Se producen las trayectorias de 1000ns en los 6 modelos.

Al finalizar la dinámica molecular de los modelos las trayectorias obtenidas son procesadas mediante el programa GROMACS con las siguientes herramientas:

1. Desviación media cuadrática de posiciones atómicas (Herramienta 'rms').
2. Desviación media cuadrática de fluctuaciones (Herramienta 'rmsf')
3. Puentes de hidrógeno (Herramienta 'HBond')
4. Distancia de los aminoácidos de los sitios activos (Herramienta 'Distance')

Para evaluar en los modelos aquellos residuos que interactúan directamente con la Coenzima A utilizamos el programa UCSF Chimera mediante la extensión "Encuentra puentes de hidrógeno". Mientras que las visualizaciones fueron generadas mediante las opciones de ilustración de los programas UCSF Chimera y Visual Molecular Dynamics. La gráfica de radar y de barras se realizaron mediante el programa Sigmaplot y GraphPad respectivamente, en este último también se realizaron los análisis estadísticos de T de Student para muestras no relacionadas.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Genotipificación

5.1.1 Población estudiada

Los pacientes incluidos en el estudio presentaron sintomatología característica de daño hepático entre la cuarta y novena semana de inicio al tratamiento anti-tuberculoso de primera línea el cual incluye: ictericia, distensión con dolor abdominal, edema de miembros superiores e inferiores, prurito generalizado, orina color oscuro y heces incoloras. En el Cuadro 1 se muestran los valores de AST y ALT para los pacientes que desarrollaron hepatotoxicidad tras el tratamiento antituberculoso⁵⁷.

Cuadro 1: Valores de enzimas transaminasas en los pacientes incluidos en casos y controles.

| Valores de transaminasas en los casos incluidos en el estudio | | | |
|---|-----------|--|--|
| ID | Genero | Aspartato aminotransferasa (AST, M:<40 U/L, F: <34 U/L) | Alanina aminotransferasa (ALT, M:<40 U/L, F: <35 U/L) |
| 1 | Masculino | 122 U/L | 97 U/L |
| 2 | Masculino | 116 U/L | 123 U/L |
| 3 | Masculino | 134 U/L | 112 U/L |
| 4 | Masculino | 124 U/L | 102 U/L |
| 5 | Femenino | 101 U/L | 87 U/L |
| 6 | Femenino | 103 U/L | 76 U/L |
| 7 | Masculino | 75 U/L | 89U/L |

5.1.2 Frecuencias alélicas y genotípicas.

Al analizar las frecuencias de alelos y genotipos de las variantes de *NAT2* en las poblaciones de estudio encontramos que todas ellas estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Cuando comparamos los resultados de las frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs1801279 (G191A) en ambos grupos encontramos que genotipo WT (GG) en casos y controles es de 100% y 99% respectivamente, con lo cual podemos concluir que esta variante resulta no informativa para el análisis (Cuadro 2).

Las frecuencias génicas y alélicas para la variante rs1799931 (G857A) en casos y controles fue coincidente para ambas poblaciones (GG=71%, GA=29%, AA=0% y G=86% y A=14%), lo que indica la similitud entre ambas poblaciones en la prevalencia de este SNP (Cuadro 2).

Para la variante rs1208 (A803G) en los casos encontramos las siguientes frecuencias genotípicas: AA=29%, AG=71%, GG=0% y en los controles: AA=43%, AG=46%, GG=11% (Cuadro 2).

Mientras tanto para la variante rs1041983 (C282T) el genotipo WT (CC) fue menos frecuente en los casos (14%) que en los controles (46%), para el genotipo heterocigoto (CT) las frecuencias son 86% y 50% y el genotipo homocigoto (TT) 0% y 4% para casos y controles respectivamente.

Las frecuencias genotípicas para los casos de la variante rs1799930 (G590A) son GG=43%, GA=57%, AA=0% y GG=76%, GA=23% y AA=1% para el grupo control.

En cuanto a la variante rs1801280 (T341C) en los casos encontramos TT=43%, CT=57%, CC=0% y los controles TT=48%, CT=44% CC=8%. Para la variante rs1799929 (C481T) los genotipos en los casos son: CC=43%, CT=57%, TT=0% y los controles CC=46%, CT=45%, TT=9%.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos casos y controles. La diferencia que existe entre los dos grupos evaluados se puede comparar mediante el valor de la frecuencia del alelo menor (MAF, del inglés Minor Allele Frequency), la cual es la frecuencia en la que se presenta el segundo alelo más común, en este estudio este valor correspondió al alelo mutado en todas las variantes y nos permite evaluar que tan frecuente es un alelo en una población e incluso compararla con otras.

Para la variante rs1799930 (G590A), que corresponde al alelo mutado (A) el MAF es mayor en casos que en controles 29% y 13% sin embargo, el valor de p no fue significativo, por otro lado, dicha variante es característica del haplotipo *NAT2**6, con un fenotipo acetilación lenta, lo cual correlaciona con lo descrito en la literatura. En el caso de la variante rs1208 (A803G) el genotipo WT (AA) se presentó en mayor frecuencia en los controles que en los casos (29% en casos y 43% en controles), sin embargo, la diferencia no resulta significativa pero marca una tendencia que podría definirse al incrementar el número de casos, este dato es particularmente interesante debido a que la presencia de este SNP es característico en el haplotipo *NAT2**12 con un fenotipo de acetilación rápido.

Por otra parte en el caso de los SNPs rs1801280 (T341C) y rs1799929 (C481T) se observa también una menor frecuencia del genotipo WT (TT y CC respectivamente) y mayor en el caso del genotipo heterocigoto (CT). (Cuadro 2).

Cuadro 2: Frecuencias genotípicas y alélicas de 91 pacientes con TBP incluidos en el estudio. Controles: pacientes con TBP. Casos: pacientes con TBP que desarrollaron daño hepático tras el tratamiento con INH.

| SNP NAT2 | Frecuencias Génicas | | | MAF | EHW |
|------------------|----------------------------|-----------|-----------|-------------|------------|
| rs1801279 | GG | GA | AA | | |
| Caso (n=7) | 100% | 0% | 0% | 0 | 1 |
| Control (n=84) | 99% | 1% | 0% | 0.1 | 1 |
| rs1041983 | CC | CT | TT | | |
| Caso (n=7) | 14% | 86% | 0% | 0.43 | 0.16 |
| Control (n=84) | 46% | 50% | 4% | 0.29 | 0.059 |
| rs1801280 | TT | CT | CC | | |
| Caso (n=7) | 43% | 57% | 0% | 0.29 | 1 |
| Control (n=84) | 48% | 44% | 8% | 0.30 | 0.8 |
| rs1799929 | CC | CT | TT | | |
| Caso (n=7) | 43% | 57% | 0% | 0.29 | 1 |
| Control (n=84) | 46% | 45% | 9% | 0.31 | 0.8 |
| rs1799930 | GG | GA | AA | | |
| Casos (n=7) | 43% | 57% | 0% | 0.29 | 1 |
| Control (n=84) | 76% | 23% | 1% | 0.13 | 1 |
| rs1208 | AA | GA | GG | | |
| Caso (n=7) | 29% | 71% | 0% | 0.36 | 0.44 |
| Control (n=84) | 43% | 46% | 11% | 0.34 | 1 |
| rs1799931 | GG | GA | AA | | |
| Caso (n=7) | 71% | 29% | 0% | 0.14 | 1 |
| Control (n=84) | 71% | 29% | 0% | 0.14 | 0.2 |

MAF: Frecuencia del alelo menor (del inglés Minor Allele Frequency), expresado en frecuencia relativa y representa la frecuencia del segundo alelo más frecuente y en todos los SNPs fue el alelo mutado. **EHW:** Equilibrio de Hardy-Weinberg, todos los SNPs se encontraron en equilibrio genético.

Se determinaron los haplotipos de acuerdo con la base de datos de N-Arilmilamina transferasas (NATs) [<http://nat.mbg.duth.gr/>] mediante el programa SHEsis (58). Los haplotipos más prevalentes en el grupo control fueron: NAT2*4 (36%), NAT2*5B (29.9%), NAT2*7B (14.8%), NAT2*6A (12.3%) y NAT2*12A (3.7%). Mientras que el grupo de casos presento: NAT2*4 (50%), NAT2*5VA (14.3%), NAT2*5U (7.11%), NAT2*5J (7.11%), NAT2*6A (7.11%), NAT2*7B (7.11%) y NAT2*12A (7.11%) (Cuadro 3).

Cuadro 3: Haplotipos más frecuentes encontrados en casos y controles de una población del noreste de México. Controles: pacientes con TBP. Casos: pacientes con TBP que desarrollaron hepatotoxicidad

| Haplotipo | SNPS | Fenotipo | Caso | Control | Valor de <i>p</i> |
|---|--|---------------|--------------|--------------|-------------------|
| NAT2*4 (WT) | NINGUNO | Rápido | 50.0% | 36.0% | <i>p</i> = 0.34 |
| NAT2*5B | rs1801280 rs1799929 rs1208 | Lento | 0% | 29.9% | <i>p</i> = 0.023 |
| NAT2*5VA | rs1801280 rs1799931 rs1799929 rs1041983 | Lento | 14.3% | 0% | * <i>p</i> <0.001 |
| NAT2*5U | rs1801280 rs1799930 rs1799929 rs1041983 rs1208 | Lento | 7.11% | 0% | * <i>p</i> <0.001 |
| NAT2*5J | rs1801280 rs1799930 rs1041983 | Lento | 7.11% | 0% | * <i>p</i> <0.001 |
| NAT2*7B | rs1799931 rs1041983 | Lento | 7.11% | 14.8% | <i>p</i> = 0.40 |
| NAT2*6A | rs1799930 rs1041983 | Lento | 7.11% | 12.3% | <i>p</i> = 0.53 |
| NAT2*12A | rs1208 | Rápido | 7.11% | 3.7% | <i>p</i> = 0.34 |
| Se muestran con un * los valores estadísticamente significativos. | | | | | |

5.2 Dinámica Molecular

Con el propósito de evaluar las divergencias de estos haplotipos a nivel de estructura proteica, evaluamos el efecto en el plegado y acceso a los sitios de unión del sustrato y cofactor de las variantes que presentan los SNPs no sinónimos rs1801280 (I114T), rs1799930 (R197Q) y rs1799931 (G286E) líderes en los haplotipos *NAT2*5*, *NAT2*6*, y *NAT2*7* variantes con un fenotipo lento de acetilación mediante análisis in-silico de dinámica molecular.

De igual manera incorporamos aquellas haplotipos de *NAT2* que incluyeran la combinación de variantes rs1801280 (I114T), rs1799930 (R197Q) y rs1799931 (G286E). Los haplotipos: *NAT2*5E*, *NAT2*5J*, *NAT2*5P*, *NAT2*5Q*, *NAT2*5R*, y *NAT2*5U* incluyen en su secuencia proteica las variantes I114T y R197Q mientras que los haplotipos *NAT2*5KA*, *NAT2*S*, *NAT2*5TA*, *NAT2*5VA* incluyen los cambios de aminoácidos I114T y G286E de acuerdo con la base de datos de NATs [nat.mbg.duth.gr].

5.2.1 Desviación media cuadrática de posiciones atómicas

Se determinó la desviación media cuadrática de posiciones atómicas (RMSD) en los modelos (a) I114T, (b) R197Q, (c) G286E, (ab) I114T+R197Q y (ac) I114T+G286E.

En la figura 6 los valores de RMSD de los modelos utilizados los cuales son presentados mediante el siguiente código de colores en negro el modelo WT, el modelo I114T en rojo, el modelo R197Q en azul, el modelo G286E en verde, el modelo I114T+R197Q en naranja y el modelo I114T+G286E en morado. Se puede observar que todos los modelos presentaron una trayectoria distinta al modelo de referencia (WT). Es evidente la divergencia que presenta el modelo G286E respecto al WT.

A 700ns de la simulación se observa que los valores de cada uno de los modelos presentaron valores de RMSD constantes (es decir que oscilaron en un rango de 2 Å de distancia), por lo que a este tiempo de simulación los modelos presentan una conformación estable en las condiciones de la simulación, es decir adoptaron un acomodo espacial donde los átomos que componen a estos modelos se mantenían en una posición constante.

Por lo que los análisis posteriores fueron llevados a cabo a partir de este tiempo de simulación, es decir los últimos 300 ns debido a que es en ese momento cuando la proteína se encuentra estable en las condiciones de simulación utilizadas (miméticas a las fisiológicas).

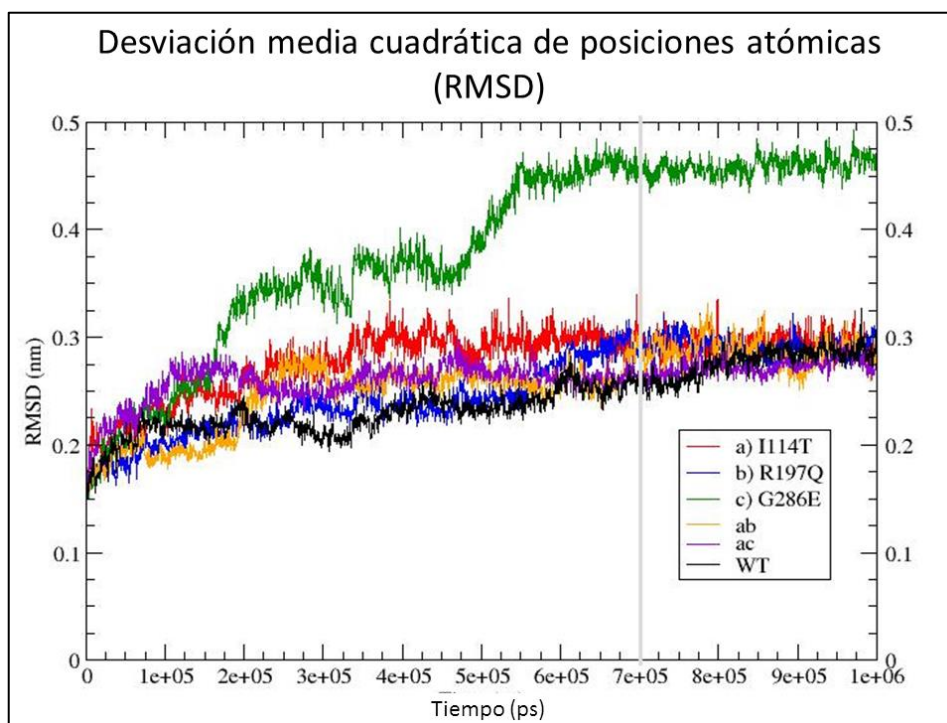


Figura 6: Valores de RMSD (desviación media cuadrática de posiciones atómicas) de las modelos.

5.2.2 Desviación media cuadrática de fluctuaciones

Se evaluó la desviación media cuadrática de fluctuaciones (RMSF) de cada aminoácido en los últimos 300 ns de simulación y se promediaron los valores superiores a 1 Å (Ångström) en los dominios de *NAT2*. Los cuales están conformados de la siguiente manera:

- El Dominio 1 incluye los aminoácidos del 1 al 83.
- El Dominio 2 incluye los aminoácidos del 84 al 192.
- El Interdominio incluye los aminoácidos del 193 al 229.
- El Dominio 3 incluye los aminoácidos del 230 al 290.

Las variantes R197Q y G286E tuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto a la WT tanto en el dominio 1 como en el interdominio. Para el dominio 1, presentaron valores menores de fluctuaciones con significancia de $p = 0.0204$ y $p = 0.0160$ respectivamente. Mientras que en la región interdominio los valores de RMSF aumentaron con significancia de $p = 0.011$ y $p = 0.0129$ respectivamente.

Por otra parte, el aumento de los valores de RMSF se observa como una tendencia en el modelo (ab) I114T+R197Q en la región interdominio, mientras que en el dominio 3 se observa la tendencia en la disminución de los valores RMSF en los modelos (b) R197Q y (ab) I114T+R197Q así como un aumento en el modelo (a) I114T. No se observan divergencias en el promedio de los valores de RMSF en el dominio 2 (Figura 7).

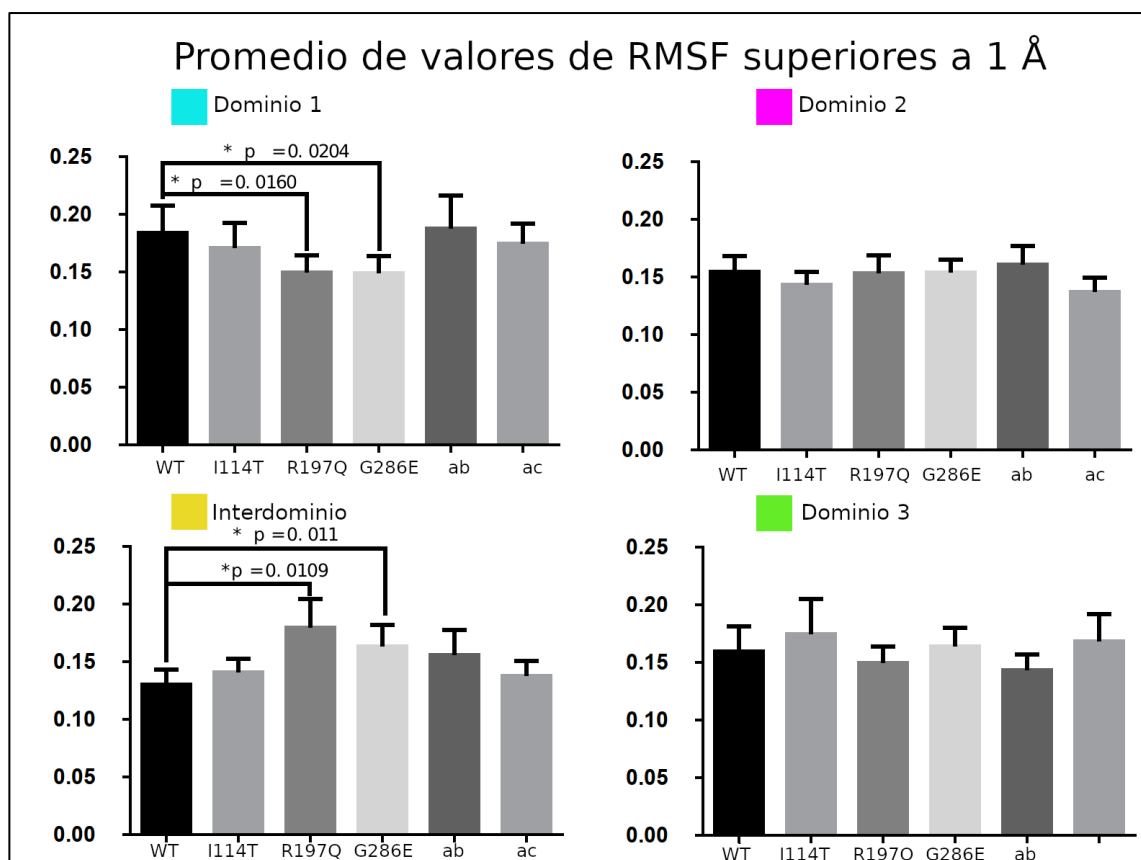


Figura 7: Promedio de valores de RMSF superiores a 1 Å de cada una de las variantes.

Se puede observar en la figura 8 donde se ubican en la estructura terciaria los átomos del sitio catalítico, la Coenzima A y las substituciones aminoácidas de los modelos evaluados. La divergencia en los valores de fluctuaciones observados en la gráfica de barras, representa un efecto directo en el sitio catalítico y la capacidad enzimática debido a que el aminoácido del sitio catalítico (C68) se encuentra dentro de los aminoácidos del dominio 1, siendo este determinante en la capacidad enzimática al ser el receptor del grupo acetilo por parte de la Coenzima A. El interdominio por su cercanía al sitio de unión al cofactor representa una región importante para el acceso de la coenzima, en esta región se ubica el cambio de aminoácido R197Q. (Figura 8).

También se puede observar la importancia del residuo I114 en el modelo WT el cual mantiene interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos L21 y L24 del Dominio 1. Por otra parte, también se puede apreciar la cercanía del residuo G286 con el sitio de unión a la coenzima A.

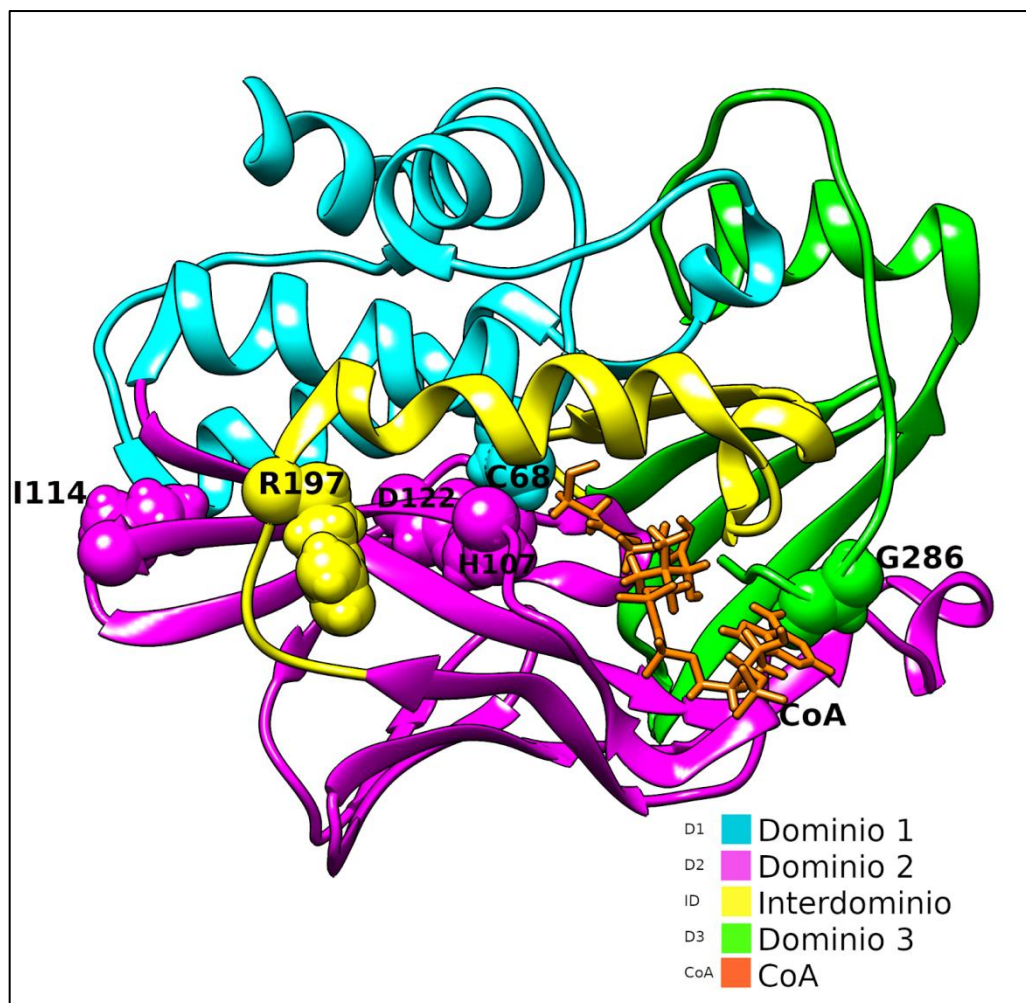


Figura 8: División en código de colores de los dominios de N-arilamina transferasa 2.

5.2.3 Sitio de unión al cofactor

Para determinar el impacto de estos SNPs en la triada catalítica (C68, H107 y D122) y el sitio de unión al cofactor (T103, G104, T214, S216 y S287) los cuales pueden observarse en la Figura 9, se cuantificó la distancia que existen entre cada uno de estos aminoácidos (átomo más pesado de estos) en cada uno de los modelos con el propósito de determinar la divergencia en estos sitios activos respecto al WT.

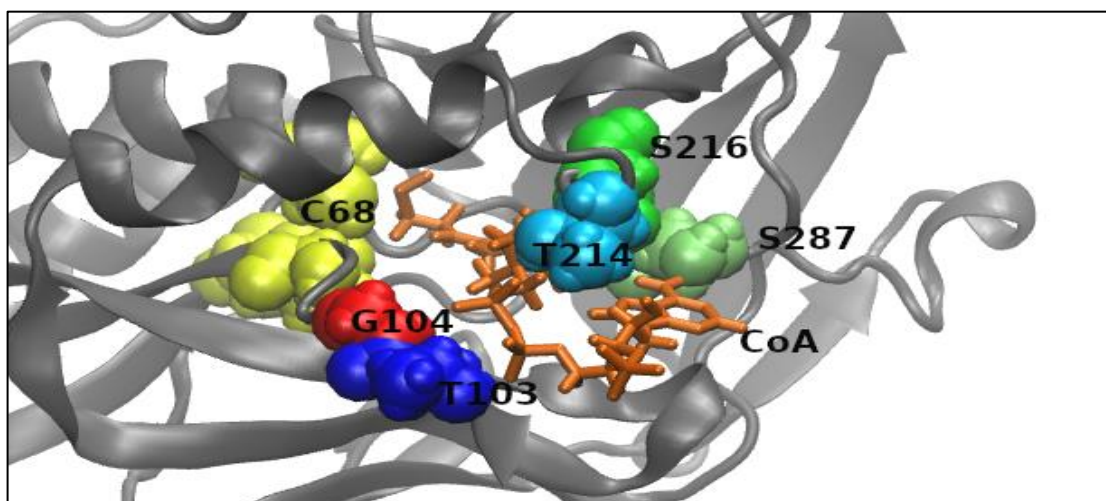


Figura 9: Aminoácidos de la triada catalítica y sitio de unión al cofactor en la estructura cristalizada de NAT2 WT.

El código de colores utilizado en la figura 10 es el siguiente: El modelo WT se presenta en color negro, el modelo I114T en color rojo, el modelo R197Q en color azul, el modelo G286E en color verde, el modelo I114T+R197Q en color naranja y el modelo I114T+G286E en color morado. La unidad de longitud empleada es el Ångström.

No se observan alteraciones significativas en el acomodo conformacional de la triada catalítica de NAT2, sin embargo, si se observa distorsión en los aminoácidos de anclaje al cofactor (Figura 10).

Los resultados de este gráfico de radar (figura 10) muestran la cuantificación de la divergencia que existe en los sitios activos de la proteína.

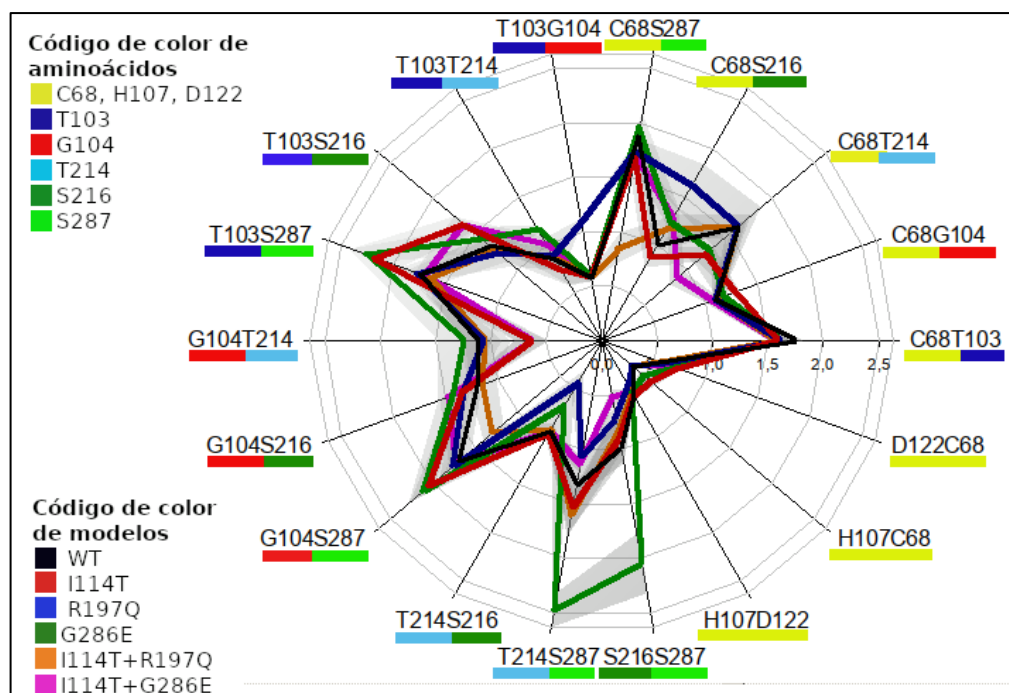


Figura 10: Gráfica de radar de las distancias que existen entre los átomos más pesados de los aminoácidos del sitio catalítico, y el sitio de unión al cofactor entre las variantes proteicas.

Esto también se puede observar en la visualización molecular de la estructura representativa de los últimos 300ns de cada uno de los modelos en el software VMD (figura 11), donde se observa la divergencia entre la estructura de referencia (WT) en gris y los modelos los cuales presentan el siguiente código de colores: I114T (Rojo), R197Q (Azul), G286E (Verde), I114T+R197 (Naranja) y I114T+G286E (Morada).

En el modelo (a) I114T se observa el desplazamiento de los aminoácidos T214 y S216 hacia el centro de la proteína respecto a la WT limitando el acceso del cofactor, se observa el movimiento de la cadena lateral exponiendo a los sitios internos de la proteína a mayor acceso del solvente a sitio hidrofóbicas.

En el modelo (b) R197Q el desplazamiento de los aminoácidos T214, S216 y S287 se desplazan hacia el centro de la proteína respecto a la WT limitando el acceso del cofactor, así mismo se observa el desplazamiento de una cadena lateral que limita el acceso del solvente (flecha de color naranja).

En el modelo (c) G286E se desplazan los aminoácidos T103, T214, S216 y S287 hacia los extremos de la proteína respecto a la WT, comprometiendo el anclaje del cofactor a su sitio de unión, y exponiendo a la proteína a un área mayor de acceso de solvente. Así mismo en el modelo (ab) I114T+R197Q también se compromete el anclaje del cofactor mediante el desplazamiento de los aminoácidos S216 y S287, la cadena lateral similar a lo sucedido con la variante I114T también se desplaza y expone los sitios internos de la proteína a mayor acceso del solvente al sitio hidrofóbico.

En el modelo (ac) I114T+G286E los aminoácidos T214, S216 y S287 se desplazan hacia el centro de la proteína respecto a la WT limitando el acceso del cofactor.

Todas las variantes conservaron su plegado proteico respecto a la WT y su estructura secundaria, a excepción de la variante G286E la cual presenta una pérdida de la α -hélice 5 (Figura 11).

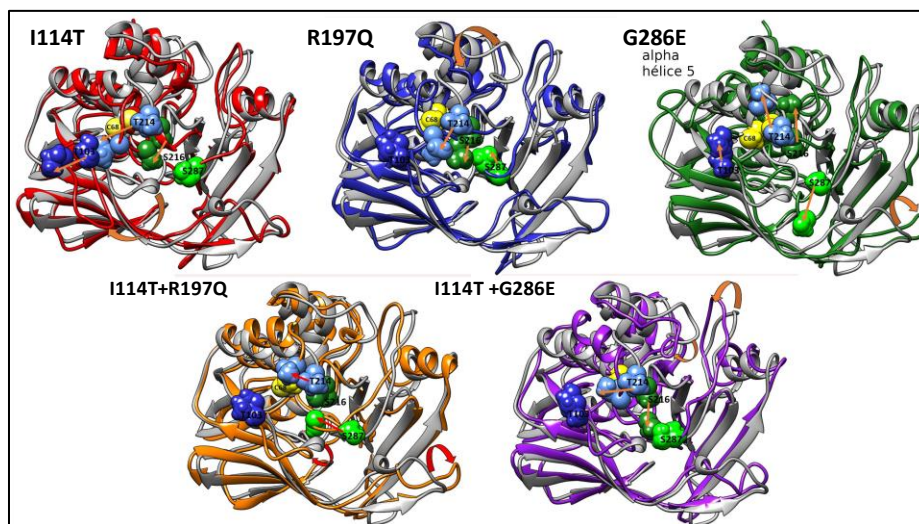


Figura 11: Visualización de la 5 variantes proteicas de NAT2 y la representación de los átomos de unión al cofactor.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Alrededor del mundo en países como Tailandia, Indonesia, China, Singapur, Japón, India, Brasil, Turquía, España, Argentina, Canadá, Corea y Etiopía han obtenido buenas correlaciones⁴⁶ entre los haplotipos lentos de *NAT2* y el desarrollo de daño hepático por INH. Así mismo la utilidad clínica de la genotipificación de *NAT2* ya ha sido evaluada en poblaciones de Japón⁵⁶ y Singapur⁵⁹ revelando un gran potencial para mejorar la respuesta al tratamiento basado en un régimen de dosificación de INH en el tratamiento antituberculoso.

En México no existen estudios sobre el tema y poco se conoce sobre la variabilidad génica de *NAT2* en población mestiza mexicana⁵⁰⁻⁵⁵, tampoco existen reportes sobre la incidencia de este efecto adverso en población mexicana. De acuerdo a la recopilación de Tostmann y colaboradores⁶⁰ que incluyó estudios entre 1996 y 2007, se estima una incidencia en el rango del 2 al 28% de daño hepático asociado al tratamiento con el régimen antituberculoso, la incidencia varía según la población; en Dinamarca el porcentaje fue del 2%⁶¹, para los Países Bajos un 6.5%⁶², para España un 10.3%⁶³, para Alemania un 11%⁶⁴, para Canadá un 12%⁶⁵, para Inglaterra un 13%⁶⁶, para India un 14%⁶⁷, para el Norte de India un 16%⁶⁸, para Estados Unidos de América un 19%⁶⁹ mientras que para Irán un 27.7%⁷⁰.

De acuerdo con nuestros resultados en la población del noreste de México, incluida en este estudio, el daño hepático tras la administración del tratamiento de primera línea ocurrió en un 7.6% (7 pacientes de 91 diagnosticados con TBP

y tratados con el régimen de primera línea desarrollaron daño hepático inducido por INH).

Los haplotipos con mayor prevalencia en pacientes tuberculosis que no desarrollaron hepatotoxicidad son: *NAT2*4*(36%), *NAT2*5B*(29%) y *NAT2*6A* (12%), estos resultados son similares a los descritos en el trabajo de tesis de Maestría del MVZ Eduardo Pérez Medina, Taja-Chayeb y colaboradores (2012), Díaz-Molina y colaboradores (2008), Ramos y colaboradores (2011) y Salazar-González y colaboradores (2014)⁵⁰⁻⁵⁵ en poblaciones mexicanas.

En el caso de pacientes con TBP que desarrollaron daño hepático tras el tratamiento con INH encontramos una alta prevalencia de los haplotipos: *NAT2*5U* (14.3%), *NAT2*VA* (7.1%) y *NAT2*5J* (7.1%) obtenidos con el software con SHEsis [analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php]⁵⁸. Estos haplotipos a diferencia de los obtenidos en la población control portan dos SNPs líderes en la disminución de la capacidad de acetilación en la misma secuencia genética. El fenotipo descrito para estas variantes es de acetilación lenta³⁵ y su prevalencia en otras poblaciones es desconocida, sin embargo otros haplotipos con esta característica (portadores de 2 SNPs líderes en la misma secuencia genética) ha sido reportada en los trabajos de Tanira y colaboradores en Omán (2003) y Luca y colaboradores en Checoslovaquia (2009)^{71,72}, así mismo están incluidas en la base de datos publicada en línea [http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT2%20alleles_2013.htm] por el Comité Internacional de Nomenclatura de *NAT1* y *NAT2*³³.

Los resultados obtenidos en la frecuencia genotípica de los individuos homocigotos mutados, heterocigotos y homocigotos WT es similar a los estudios realizados en poblaciones mexicanas por Pérez-Medina E. (2005), Taja-Chayeb y colaboradores (2012), Cornejo-Bravo y colaboradores (2008), Ramos y colaboradores (2011) y Portales-Pérez y colaboradores (2014) donde se observa una tendencia a un mayor porcentaje de individuos heterocigotos y homocigotos mutados que de homocigotos WT. La actividad enzimática de *NAT2* en individuos homocigotos mutados y heterocigotos (que presentan un

haplotipo lento y un haplotipo rápido) es significativamente menor que individuos con el genotipo WT⁵⁴, de acuerdo con la tasa de N-acetilación urinaria de metabolitos de cafeína evaluado por Selinski y colaboradores en el 2013⁷³ y evaluación por parte de Hein y colaboradores en el 2007⁴³ del efecto de los SNPs rs1801279, rs1801280, rs1799929, rs1799930, rs1208, y rs1799931 en la capacidad de N-acetilación mediante la expresión de estas variantes en línea celular utilizando SMZ como sustrato⁴³, posteriormente utilizando INH como sustrato por Doll y colaboradores en el 2017⁷⁴ y Salazar-González y colaboradores en el 2018⁵⁴.

En base a frecuencia haplotípicas en nuestra población de estudio se realizaron simulaciones computacionales de dinámica Molecular con el propósito de evaluar el efecto de los SNPs líderes en la estructura proteica de los haplotipos más prevalentes, debido a que en la literatura se encuentra gran heterogeneidad entre la capacidad enzimática de cada una de las variantes de acuerdo con Doll y Hein en el 2017⁷⁴.

Nuestro trabajo comprende la simulación computacional de las variantes I114T (rs1801280), R197Q (rs1799930), G286E (rs1799931) incluidas en un estudio antecedente por Rajasekaran y colaboradores en el 2011⁴⁵ y dos variantes inéditas I114T+R197Q (rs1801280 + rs1799930) y I114T+G286E (rs1801280 + rs1799931) que se presentan en las variantes *NAT2*5U*, *NAT2*5VA* y *NAT2*5J* presentes únicamente en el grupo de casos de nuestro estudio y comprende mayor tiempo de simulación por cada uno de los modelos (1000ns, respecto a 320ns del estudio antecedente) así como un campo de fuerza que considera todos los átomos (OPLS-AA) que ofrece mayor robustez de los resultados.

Las variantes R197Q y G286E presentaron un menor promedio de valores de RMSF en el Dominio 1 respecto a la wild type con una significancia de $p=0.0204$ y $p=0.0160$ respectivamente mediante la prueba estadística T de student y a su vez presentaron un mayor promedio en el interdominio ($p=0.011$ y $p=0.0129$). El análisis de RMSF permite evaluar la flexibilidad y rigidez de

las variantes, lo cual tiene repercusión en la estabilidad y funcionalidad de la enzima *NAT2*, por lo que estas dos variantes presentan una mayor rigidez en el dominio 1 donde se encuentra el residuo catalítico C68 (aceptor del grupo acetilo) lo cual podría limitar la especificidad por el sustrato y una mayor flexibilidad en el interdominio el cual se pliega sobre el sitio activo^{34,75}, un incremento en la flexibilidad de este tiene repercusiones en anclaje de la Coenzima A y/o permitir mayor acceso al solvente a sitios hidrofóbicos disminuyendo su estabilidad.

El dominio 1 y el dominio 2 son regiones altamente conservadas en la enzima entre los reinos eucariotas y procariotas porque lo que su conservación en localización y dinámica es esencial en la función enzimática, mientras que el interdominio y el dominio 3 son esenciales en la transferencia del grupo acetilo hacia el sustrato de acuerdo con Sim E. y colaboradores en el 2001^{34,75}.

El número de puentes de hidrógeno y el plegado proteico se mantiene en todos los modelos respecto a la WT, consistente con el trabajo Rajasekaran y colaboradores en el 2011⁴⁵. La estructura secundaria también se mantiene en todos los modelos a excepción de la α -hélice 5 en el modelo G286E.

Se cuantificó la distorsión en el sitio de unión al cofactor y en el sitio de unión a sustrato (triada catalítica), mediante la cuantificación de la distancia de los átomos D122, H107, C68 (triada catalítica), T103, G104, T214, S216 y S287 (aminoácidos del sitio de unión al cofactor) que componen estos dos sitios activos, todas las variantes presentaron una distorsión en el sitio de unión al cofactor, pero no en la triada catalítica, lo cual compromete la donación del grupo acetilo de la coenzima A hacia el residuo C68 y/o el anclaje del cofactor a su sitio activo en comparación al modelo WT.

Nuestros resultados indican que los SNPs rs1801280 (I114T, *NAT2**5), rs1799930 (R197Q, *NAT2**6) y rs1799931 (G286E, *NAT2**7) presentan distorsión en los aminoácidos que corresponden al sitio de unión al cofactor y consecuentemente en la capacidad de acetilación debido a la importancia de

este sitio activo en la actividad enzimática. Previamente Hein y Doll en el 2012⁷⁶ propusieron un panel de 4 SNPs el cual incluye las variantes rs1801279 (*NAT2**14), rs1801280 (*NAT2**5), rs1799930 (*NAT2**6) y rs1799931 (*NAT2**7), debido a que las variantes rs1041983 (*NAT2**11), rs1208 (*NAT2**12) y rs1799929 (*NAT2**13) son haplotipos que presentan un fenotipo rápido equivalente a el haplotipo WT (*NAT2**4)⁴³, de acuerdo con nuestros resultados la genotipificación de *NAT2* y la dinámica molecular de la secuencia proteica, puede reducirse incluso a un panel de 3 SNPs debido a la baja prevalencia de la variante rs1801279 (*NAT2**14) en la población analizada disminuyendo costos y tiempo para la determinación del fenotipo de acetilación.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 Conclusiones

Este es un primer reporte de las frecuencias alélicas, génicas y haplotípicas de *NAT2* en pacientes con TBP y aquellos que desarrollaron daño hepático tras el tratamiento antituberculoso de primera línea en una población del noreste de México, así mismo este estudio permitió conocer el de efecto sustituciones no sinónimas en la estructura proteica debido a la presencia génica de SNPs.

De acuerdo con nuestros resultados el 7.6% de los pacientes desarrollaron daño hepático inducido por el tratamiento con INH. El SNP rs1801279 se encontró ausente en los casos y tan solo en un 1% en la población control, mientras que los SNPs rs1801280, rs1799929 y rs1799931 presentaron frecuencias alélicas similares entre casos y controles, por otra parte, los SNPs rs1041983 y rs1799930 se encontraron en mayor prevalencia en casos que en controles.

Los haplotipos derivados de *NAT2**5 fueron los más prevalentes después del haplotipo WT (*NAT2**4) en casos y controles, sin embargo, en casos se presentaron los haplotipos *NAT2**5Va, *NAT2**5U y *NAT2**5J que se encontraron ausentes en la población control donde el haplotipo más frecuente fue *NAT2**5B.

Los estudios in-sillico de dinámica molecular de los SNPs líderes en la disminución de la actividad enzimática de *NAT2* : rs1801280 (que corresponde a

un cambio de aminoácido I114T), rs1799930 (que corresponde a un cambio de aminoácido R197Q) y rs1799930 (que corresponde a un cambio de aminoácido G286E) y la combinación de estos: rs1801280 + rs1799930 y rs1801280 + rs1799931 debido a que estas combinaciones se encuentran presentes en los haplotipos *NAT2*5Va*, *NAT2*5U* y *NAT2*5J* encontrados únicamente en casos.

En los estudios in-silico de dinámica molecular de los SNPs líderes en la disminución de la actividad enzimática de *NAT2*, se pudo cuantificar el efecto de estos en la estructura proteica y el efecto en los sitios activos de la enzima. Mientras que en el sitio catalítico (C68, H107, D122) no hubo un efecto significativo entre los modelos y el modelo WT; en el sitio de unión al cofactor (T103, G104, T214, S216 y S287) se observó una diferencia en todas los modelos respecto al WT, por lo que nuestros resultados indican que la disminución de la actividad de *NAT2* por efecto de los SNPs rs1801280, rs1799930 y rs1799931 podría deberse a un cambio en el acomodo espacial de los aminoácidos de unión al cofactor, debido a la importancia del sitio de unión al cofactor en el mecanismo de reacción enzimático, puesto a que este dona el grupo acetil al residuo C68 quien posteriormente lo donará al sustrato de la enzima.

De acuerdo con nuestros resultados no fue posible establecer una asociación entre los haplotipos lentos y el desarrollo de este efecto adverso debido a que existen otros factores que pudieran estar involucrados en el desarrollo de este efecto adverso, sin embargo se puede observar que estos SNPs si tienen un efecto en la estructura proteica se relaciona con la disminución de su actividad enzimática.

6.2 Perspectivas

Incrementar el número de individuos incluidos en la población de casos que cumplan con las características bioquímicas, y manifestaciones clínicas del

daño hepático inducido por INH, con el fin de obtener resultados con mayor robustez.

Evaluar la implicación de la alta variabilidad génica que existe en otras enzimas metabólicas como la familia de citocromos p450, y GSH, y su capacidad de detoxificación, en relación al estrés oxidativo y el desarrollo del daño hepático inducido por INH.

Evaluar importancia del genotipo *NAT2* con el metabolismo y efectos tóxicos de otros sustratos de esta enzima.

CAPÍTULO 8

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La disposición de los residuos generados se realizó de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas y el Centro de Investigación Biomédica del Noreste de la siguiente manera:

- **Contenedor A:** Soluciones salinas pH = 6-8.
- **Contenedor C:** Tóxicos e inflamables. Combinaciones orgánicas no halogenadas líquidas, bases orgánicas y amidas.
- **Contenedor hermético color rojo:** Objetos punzocortantes y restos de sangre total.
- **Basura industrial:** Guantes de plástico y látex, absorbentes que utilizados para contener derrames, papel impregnado.
- **Plástico impregnado con sustancias peligrosas:** Material de plástico en contacto con reactivos o residuos peligrosos.

Los residuos fueron distribuidos en cada recipiente de acuerdo a la clasificación, posteriormente y de acuerdo a la programación y especificaciones del departamento responsable se recolectaron y traspasaron a contenedores de mayor capacidad para almacenamiento temporal, previo a su recolección por parte de una organización externa contratada para la disposición final.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. *World Health Organization, Global Tuberculosis Report*. s.l. : Licence CCBY-NC-SA3.0IGO, 2019.
2. *Biogénesis del fagolisosoma micobacteriano y su papel en el procesamiento y presentación de antígeno*. Bobadilla-lozoya K, Rivas-Santiago B., Sada-Díaz E., Torres-Rojas M. 1, s.l. : REV INST NAL ENF RESP MEX, 2009, Vol. 22.
3. CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. [Online] [Cited: 03 27, 2020.] <https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/sintomastuberculosis/index.html>.
4. *Tuberculosis treatment*. Rabahi FM, Rodrigues da Silva J, Galvao A, Tannus-Silva D, Barreto C., 5, s.l. : J Bras Pneumol, 2017, Vol. 43.
5. *The importance of adherence in tuberculosis treatment clinical trials and its relevance in explanatory and pragmatic trials*. Vernon A, Fielding K, Savic R, Dodd L, Nahid P. 12, s.l. : PLOS ONE Medicine, 2019, Vol. 16.
6. *Determinants of lost to follow up during treatment among tuberculosis*. Heemanshu A, Satwanti K. 1, s.l. : International Journal of Medical Research Health Sciences, 2016, Vol. 5. ISSN No: 2319-5886.
7. OPS. *Organización Panamericana de la Salud, Tuberculosis en las Américas*. Washington : OPS/CDE/18-036, 2018.
8. WHO. *World Health Organization, The end TB strategy*. Geneva : s.n., 2015.
9. *Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population*. Zink A, Hass CJ, Szeimies U, Nerlich AG. 4, s.l. : J Med Microbiol, 2001, Vol. 50.

10. *The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus.* **Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M.** 1, s.l. : J Prev Med, 2017, Vol. 58.
11. *Global epidemiology of Tuberculosis and progress toward achieving global targets -2017.* **Macneil A, Glaziou P, Sismanidis C, Maloney S, Floyd K.** s.l. : MMWR Morb Mortal Wkly Rep , 2019, Vol. 68.
12. *Tuberculosis therapy: past, present and future.* **MD, Iseman.** 87s-94s, s.l. : Eur. Respir Journal, 2002, Vol. 20.
13. *The biology of Mycobacterium tuberculosis infection.* **Delogu G, Sali M, Fadda G.** 1, s.l. : Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases, 2013, Vol. 5.
14. *Phenotypic variation of Salmonella in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy.* **Claudi B, Spröte P, Chirkova A, Personnic N, Zankl J, Schürmann N, Schmidt A, Bumann D.** 4, s.l. : Cell, 2014, Vol. 158.
15. National Human Genome Research Institute. *National Human Genome Research Institute.* [Online] [Cited: Marzo 25, 2020.] <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Polimorfismos-de-nucleotido-%C3%BAnico>.
16. *SNPs, Protein Structure, and Disease.* **Wang Z, Moul J.** 1, s.l. : human mutation, 2001, Vol. 17.
17. *Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation.* **Robert F, Pelletier J.** s.l. : Front. Genet., 2018.
18. *Drug-Induced liver injury and drug development: industry prespective.* **A, Regev.** 2, s.l. : Semin Liver Dis, 2014, Vol. 34.
19. *Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) - Current Issues and Future Prespectives.* **Kana L, Božić I, Kizivat T, Bojanic K, Mrso M., Kralj E, Smolic R, Wu G, Smolic M.** 1, s.l. : Bentham Science, 2018, Vol. 19.
20. *Mechanisms of isoniazid-induced idiosyncratic liver injury: Emerging role of mitochondrial stress.* **Boelsterli U, Lee K.** 4, s.l. : Gastroenterology and hepatology journal, 2014, Vol. 29.

21. *Hepatotoxicity related to anti-tuberculosis Drugs: Mechanisms and management.* **Ramappa V, Aithal G.** 1, s.l. : J Clin Exp Hepatol, 2013, Vol. 3.
22. *Anituberculosis therapy drug-induced liver injury and acute liver failure.* **Devarbhavi H, Deirjhising R, Kremers WK.** 1, s.l. : Hepatology, 2010, Vol. 52.
23. *Drug-induced liver injury from antituberculous treatment: a retrospective study from a large TB centre in the UK.* **Abbara A, Chitty S, Roe J, Ghani R, Collin S, Ritchie A, Kon O, Dzvoza J, Davidson H, Edwards T, Hateley C, Routledge M, Buckley, Davidson R, Laurence J.** 1, s.l. : BMC infec Dis, 2017, Vol. 17.
24. *Reducing Risk of Severe liver injury in patients treated with isoniazid.* **R, Andrade.** 9, s.l. : Clin Gast Hapatol, 2015, Vol. 13.
25. *Serum transaminase elevations and other hepatic abnormalities in patients receiving Isoniacid.* **Lawrence S, Smith J.** 6, s.l. : Ann Intern Med, 1969, Vol. 71.
26. *Biomarkers of drug-induced liver injury: progress and utility in research, medicine and regulation.* **McGill M, Jaeschke H.** 9, s.l. : Expert Rev Mol Diagn, 2018, Vol. 18.
27. *Genetic Variations associated with antituberculosis drug-induced liver injury.* **Bao Y, Rasmussen T, Zhong XB.** 3, s.l. : Curr Pharmacol rep, 2018, Vol. 4.
28. *Variation in NAT2 acetylation phenotypes is associated with differences in food-producing subsistence modes and ecoregions in Africa.* **Podgorná E, Diallo I, Vangenot C, Sanchez-Mazas A., Sabbagh A, Cerny V, Poloni E.** 1, s.l. : BMC Evolutionary Biology, 2015.
29. National center for biotechnology information. *NCBI.* [Online] [Cited: 03 25, 2020.] ncbi.nlm.nih.gov/gene/10.
30. *Acetylation pharmacogenetics: The slow acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine N-acetyltransferase in human liver.* **Grant DM, Mbrike K, Eichelbaum M, Meyer UA.** 1, s.l. : The Journal of clinical investigation, 1990, Vol. 85.
31. SNPedia. *NCBI.* [Online] [Cited: 03 25, 2020.] snpedia.com/index.php/NAT2.
32. *definition and clinical importance of haplotypes.* **Crawford D, Nickerson D.** 1, s.l. : Ann Rev Med, 2005, Vol. 56.

33. **Boukouvala S.** Arylamine N-acetyltransferases (NATs) database. [Online] [Citado: 03 25, 2020.] nat.mbg.duth.gr.
34. **Sim E, Laurieri N.** Arylamine N-acetyltransferases: From drug metabolism and pharmacogenetics to drug discovery. [book auth.] Sim E. *Arylamine N-acetyltransferases: From drug metabolism and pharmacogenetics to drug discovery*. s.l. : World scientific publishing Co. Pte. Ltd. 2018 ISBN: 9789813232006, 2014.
35. *PharmGKB summary: very important pharmacogene information for N-acetyltransferase 2.* **McDonagh E, Boukouvala S, Eleni A, David H, Alman R, Teri K.** s.l. : Pharmacogenetics and genomics, 2014.
36. *Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now.* **Metushi I, Uetrecht J, Phillips E.** 6, s.l. : Br J Clin Pharmacol, 2016, Vol. 81.
37. *Tesis: Polimorfismo NAT2 y patología humana.* **JM, García Menaya.** España : Universidad de Extremadura, 2001.
38. *NAT2 gene polymorphism: convert drug interaction causing phenytoin toxicity.* **Adithan C, subathra A.** 1, s.l. : Indian J Med Res, 2016, Vol. 143.
39. *GROMAC 2020.1 MANUAL.* **Lindahl, Abraham, Hess, Van der Spoel.** 2019.
40. *Molecular dynamics simulations: advanced and applications.* **Hospital A, Goñi JR, Orozco M., Gelpi J.** s.l. : Advances and application in bioinformatics and chemistry, 2015, Vol. 8.
41. *Dynamics of folded proteins.* **McCammon JA, Gelin BR, Karplus M.** s.l. : Nature, Vol. 267.
42. *Comparasion of inter- and intraspecies variation in humans and fruit flies.* **Shih J, Hodge R., Andrade-Navarro M.** s.l. : Genomics Data, 2015, Vol. 3.
43. *Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2.* **Zang Y, Doll M, Zhao S, States JC, Hein DW.** 8, s.l. : Carcinogenesis, 2007, Vol. 28.
44. *Structure/function Evaluations of single nucleotide polymorphism in Human N-acetyltransferase 2.* **Walraven J, Zang Y, Trent J, Hein DW.** s.l. : Curr Drug Metab, 2008, Vol. 9.

45. *Effect of single nucleotide polymorphism on human N-acetyltransferase 2 structure and dynamics by molecular dynamics simulation.* **Rajasekaran M, Abirami S, Chen C.** s.l. : PLoS ONE, 2011, Vol. 6.
46. *The association between the NAT2 genetic polymorphisms and risk of DILI during anti-TB treatment: a systematic review and meta-analysis.* **Zhang M, Wang S, Wilffert B, Tong R, van Sooling D, van den Hof S, Alffenaar JW.** 12, s.l. : Br J Clin Pharmacol, 2018, Vol. 84.
47. *Hepatotoxicity during TB treatment in people with HIV/AIDS related to NAT2 polymorphisms in Pernambuco, Northeast Brazil.* **Araujo-Mariz C, Militao de Albuquerque MF, Lopes E, Ximenes R, Lacerda H, Mirando-Filho D, Lustosa-Martins B, Pastor AF, Aciolli-Santos B.** 2, s.l. : Annals of hepatology, 2020, Vol. 19.
48. *NAT2 Slow acetylator is associated with anti-tuberculosis drug-induced liver injury severity in Indonesian population.* **Yuliwulandari R, Prayuni K, Susilowati R, Sofro A, Tokunaga K, Shin JG.** 18, s.l. : Pharmacogenomics, 2019, Vol. 20.
49. *Relevance of NAT2 genotype to anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Chinese Han population.* **Lu L, Tao B, Wei H, Chen H, He X, Pan H, Yang M, Yi H, Tang S.** 6, s.l. : J Gene Med, 2019, Vol. 21.
50. *Tesis: Caracterización del genotipo N-acetiltransferasa 2 (NAT2) en una muestra de la población del noreste de México.* **Pérez-Medina EB,** San Nicolás de los Garza : UANL, 2005.
51. *Genotype and phenotype of NAT2 and the occurrence of adverse drug reactions in Mexican individuals to an isoniazid-based prophylactic chemotherapy for Tuberculosis.* **Díaz-Molina R, Cornejo-Bravo J, Ramos-Ibarra M, Estrada-Guzmán J, Morales-Arango O, Reyes-Báez R, Robinson-Navarro O, Soria-Rodríguez C.** 6, s.l. : Mol Med Rep, 2008, Vol. 1.
52. *Arylamine N-transferase 2 genotypes in a Mexican population.* **Taja-Chayeb, Agundez JA, Míguez-Muñoz C, Chavez-Blanco A, Dueña-Gonzales A.** s.l. : Genet Mol Res, 2012, Vol. 11.
53. *Expression of NAT2 in immune system cells and the relation of NAT2 gene polymorphisms in the anti-tuberculosis therapy in Mexican mestizo population.* **Salazar-Gonzales R, Gomez R, Romano-Moreno S, Modellín-Garibay S, Nuñez-Ruiz A, Magaña-Aquino M, Millán-Segovia R, Portales-Pérez D.** s.l. : Mol Bio Resp, 2014, Vol. 41.

54. *Expression and genotype-dependent catalytic activity of N-acetyltransferase 2 (NAT2) in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by Sirtuin 1.* **Salazar-González RA, Turiján-Espinoza E, Hein DW, Segovia RC, Uresti-Rivera E, Portales-Pérez DP.** s.l. : Biochem Pharmacol, 2018, Vol. 156.
55. *Pharmacogenetic screening of N-acetyltransferase 2, thiopurine S-Methyltransferase, and 5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphism in Northwestern Mexicans.* **Ramos MA, Mares RE, Avalos ED, Hernández A, Hernández R, Lameda R, Malvárez A, Rodríguez C, Rodríguez R.** 5, s.l. : Genet Test Mol Biomarkers, 2011, Vol. 15.
56. *NAT2 genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6 month four-drug standard treatment of tuberculosis: A randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy.* **Azuma J, Ohno M, Kubota R, Yokota S, Nagai T, Tsuyuguchi K, Okuda Y, Takashima T, Kamimura S, Fujio Y, Kawase I.** 5, s.l. : Eur J Clin Pharmacol, 2013, Vol. 69.
57. *SHESis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction and genetic association at polymorphism loci.* **Shi YY, He L.** 2, s.l. : Cell Res, 2005, Vol. 15.
58. *Transaminasas: Valoración y significación clínica .* **García Martín M, Zurita-Molina A.,** s.l. : Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNP-AEP.
59. *Association and clinical utility of NAT2 in the prediction of Isoniazid-Induced Liver Injury in Singaporean patients.* **Chan SL, Chua A, Aminkeng F, Chee C, Jin S, Gan S, Wang Y, Brunham.** 10, s.l. : PLoS One, 2017, Vol. 12.
60. *Liver injury during antituberculosis treatment: An 11-year study.* **Døssing, M., Wilcke, J. T. R., Askgaard, D. S., & Nybo, B.** 4, s.l. : Tubercle and Lung Disease, 1996, Vol. 77.
61. *Hepatotoxicity of Rifampin-Pyrazinamide and Isoniazid Preventive Therapy and Tuberculosis Treatment.* **Van Hest, R., Baars, H., Kik, S., van Gerven, P., Trompenaars, M.-C., Kalisvaart, N., ... Cobelens, F.** 4, s.l. : Clinical Infectious Diseases, 2004, Vol. 39.

62. *Severe Hepatotoxicity Due to Anti-Tuberculosis Drugs in Spain.* **Tost JR, Vidal R, Cayla J, Diaz-Cabanela D, Jimenez A, Broquetas JM.** 5, s.l. : Int J Tuberc Lung Dis, 2005, Vol. 9.
63. *Risk factors for side-effects of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis.* **Schaberg T, Rebhan K, Lode H.** s.l. : Eur Respiratory J, 1996.
64. *Yee, D., Valiquette, C., Pelletier, M., Parisien, I., Rocher, I., & Menzies, D. (2003). Incidence of Serious Side Effects from First-Line Antituberculosis Drugs among Patients Treated for Active Tuberculosis. . Yee, D., Valiquette, C., Pelletier, M., Parisien, I., Rocher, I., & Menzies, D. 11, s.l. : American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2003, Vol. 167.*
65. *Adverse events and treatment interruption in.* **Breen RA, Miller RF, Gorsuch T, Smith CJ, Schwenk A, Holmes W, Ballinger J, Swaden L, Johnson MA, Cropley I, Lipman MC.** s.l. : Thorax, 2006, Vol. 61.
66. *Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study.* **Pande JN, Singh SP, Khilnani GC, Khilnani S, Tandon RK.** s.l. : Thorax, 1996, Vol. 51. .
67. *Cytochrome P450 2E1 Genotype and the Susceptibility to Antituberculosis Drug-Induced Hepatitis.* **Huang YS, Chern HD, Su WJ.** 4, s.l. : Hepatology, 2003, Vol. 37.
68. *Antituberculosis Drug-induced Hepatotoxicity.* **Ungo, J. R., Jones, D., Ashkin, D., Hollender, E. S., Bernstein, D., Albanese, A. P., & Pitchenik A. E.** 6, s.l. : American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1998, Vol. 157.
69. *Evaluation of Patient-Related Factors Associated With Causality, Preventability, Predictability and Severity of Hepatotoxicity During Antituberculosis [Correction of Antituberculosis] Treatment.* **Sharifzadeh M, Rasoulinejad M, Valipour F, Nouraie M, Vaziri S.** 4, s.l. : Pharmacol Res, 2005, Vol. 51.
70. *Distribution of arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) genotypes among Omanis .* **Tanira M, Simsek M , Balushi K, Lawatia K, Barawani H, Bayoumi R.** s.l. : SQU JOURNAL FOR SCIENTIFIC RESEARCH: MEDICAL SCIENCES, 2003, Vol. 5.
71. *Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. .* **Hein, D. W. .** s.l. : Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2002.

72. *refinement of the prediction of N-acetyltransferase 2 (NAT2) phenotypes with respect to enzyme activity and urinary bladder cancer risk.* **Selinski S, Blaszkewicz M, Ickstadt K, Hengstler JG, Golka K.** s.l. : Arch Toxicol, 2013, Vol. 87.

73. *Arylamine N-acetyltransferase 2 genotype-dependent N-acetylation of isoniazid in cryopreserved human hepatocytes.* **Doll MA, Salazar-González R, Boddulori S, Hein DW.** 4, s.l. : Acta Pharmaceutica Silica B, 2017, Vol. 7.

74. *Genetic heterogeneity among slow acetylators Nacetyltransferase 2 phenotypes in cryopreserved human.* **Doll MA, Hein DW.** 7, s.l. : Arch Toxicol. , 2017, Vol. 91.

75. *Eubacterial Artlamine N-acetyltransferases - identification and comparison of 18 members of the Protein family with conserved active site cysteine, histidine and aspartate residues.* **Payton M, Mushtaq A, Yu TW, Wu LJ, Sinclair J, Sim E.** 5, s.l. : Microbiology, 2001, Vol. 147.

76. *Accuracy of various human NAT2 SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylator phenotypes.* . **Hein, D. W., & Doll, M.** 1, s.l. : Pharmacogenomics, Vol. 13.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Nombre: Aldo Fernando Herrera Rodulfo.

Licenciatura: Químico Farmacéutico Biólogo por la UANL. (Egresado 2018)

Lugar de nacimiento: Monterrey, Nuevo León, México.

Fecha de nacimiento: 25 de abril de 1996

Candidato para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia.